

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial)**



**TESIS DOCTORAL**

**Detección de herpesvirus y bacterias periodontopatógenas en muestras  
de fluido crevicular gingival y saliva en periodontitis crónica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Alicia Herrero Sánchez**

Director

Juan Antonio García Nuñez

Madrid, 2016

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA III**



**DETECCIÓN DE HERPESVIRUS Y  
BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS  
EN MUESTRAS DE FLUIDO  
CREVICULAR GINGIVAL Y SALIVA EN  
PERIODONTITIS CRÓNICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Alicia Herrero Sánchez**

**Director: Prof. Dr. D. Juan Antonio García Núñez**

**MADRID, 2015**



*A la memoria de mi madre*

*A mi padre*

*A José Luis*



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Prof. Juan Antonio García Núñez, por brindarme la posibilidad de realizar este proyecto, confiar en mí y dirigir esta Tesis con dedicación. Por todo lo que he aprendido trabajando a su lado y por su incondicional apoyo.

Al Ilustre Colegio Oficial de Odontólogos y Estomatólogos de la 1ª Región, por la concesión de la Beca de Investigación, sin cuyo soporte económico no hubiera sido posible llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Ana Isabel García Kass, por su participación en la toma de muestras.

A la Dra. Blanca Bermejo y al Dr. Raúl Santamaría, del Laboratorio de Microbiología Dr. Echevarne, por los consejos técnicos sobre PCR.

A la Dra. Carmen Bravo, por su ayuda en el análisis estadístico.

A todos los profesores que han contribuido a mi formación y enriquecido mi vida con su docencia, en especial, al Prof. Mariano Sanz, Prof. David Herrera, Prof. Antonio Bascones, Prof. Germán Esparza, Prof. Rocío Cerero, Prof. Margarita Iniesta, Prof. Isabel Santa Cruz y al Dr. Ion Zabalegui. A los profesores del Master de Periodoncia de la UCM.

A los familiares y amigos que me han apoyado a lo largo de estos años, y que han sabido comprender la falta de dedicación que tuve hacia ellos durante el tiempo de este trabajo: en especial, a mi hermano Alejandro, a mi cuñada Belén y a mi sobrina Noa. A mis grandes amigos: Silvia, por sus consejos y tiempo dedicado en la revisión de este trabajo; a Javier, por su ayuda con la traducción; a Raquel, Laura, Isabel, Sagrario y a mis “dentistillas”. A todos los compañeros de la UCM y URJC.

A mis padres, porque todo lo que soy se lo debo a ellos. Por educarme en el esfuerzo y la constancia.

A José Luis, por el apoyo y paciencia que demuestra día a día, al permitir dedicar parte de nuestro tiempo en mi realización personal y profesional. Sin ti, esto no hubiera sido posible.



# ÍNDICE

---





# Índice

---

<b>ABREVIATURAS</b>	1
<b>RESUMEN</b>	5
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	9
<b>1. Enfermedades periodontales</b>	11
1.1. Epidemiología	11
1.2. Etiología y factores de riesgo	12
1.3. Clasificación de las enfermedades periodontales	19
<b>2. Familia <i>Herpesviridae</i></b>	21
2.1. Clasificación y nomenclatura	21
2.2. Estructura	22
2.3. Ciclo infeccioso	23
2.4. Citomegalovirus humano	25
2.4.1. Estructura	25
2.4.2. Ciclo replicativo y latencia	26
2.4.3. Respuesta inmune frente al virus	28
2.4.4. Manifestaciones clínicas	29
2.4.5. Epidemiología	30
2.5. Virus de Epstein-Barr	31
2.5.1. Estructura	31
2.5.2. Ciclo replicativo y latencia	33
2.5.3. Respuesta inmune frente al virus	35
2.5.4. Manifestaciones clínicas	36
2.5.5. Epidemiología	37
2.6. Métodos de detección del CMV y VEB	37
2.6.1. Métodos indirectos	38
2.6.2. Métodos directos	38
<b>3. Asociación entre las enfermedades periodontales y los herpesvirus (CMV y VEB)</b>	45
3.1. Estudios de prevalencia	46
3.2. Asociación entre el CMV y el VEB	51

3.3. Posibles mecanismos patogénicos que explican la relación entre la infección por CMV y VEB y las enfermedades periodontales	51
<b>4. Utilidad de la saliva en microbiología periodontal</b>	55
4.1. Saliva como método diagnóstico de herpesvirus (CMV y VEB)	57
4.2. Saliva como método diagnóstico de bacterias periodontopatógenas	59
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b>	63
<b>III. HIPÓTESIS</b>	67
<b>IV. OBJETIVOS</b>	71
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	75
1. Población de estudio	77
2. Diseño experimental	78
3. Parámetros clínicos	79
4. Estudio microbiológico	80
5. Análisis estadístico	88
<b>VI. RESULTADOS</b>	91
1. Características poblacionales	93
2. Variables clínicas	94
2.1. Características clínicas de los grupos de estudio	94
2.2. Características clínicas de las localizaciones	95
3. Detección de ADN de CMV y VEB en muestras de FGC y saliva mediante PCR en tiempo real	96
3.1. Detección de ADN de CMV y VEB en muestras de FGC	96
3.2. Detección de ADN de CMV y VEB en muestras de saliva	97
3.3. Concordancia entre la muestra de FCG y saliva para la detección de CMV y VEB	98
4. Detección de bacterias periodontopatógenas en muestras de FGC y saliva mediante PCR convencional	99
4.1. Detección de bacterias periodontopatógenas en muestras de FGC	99

4.2. Detección de bacterias periodontopatógenas en muestras de saliva	104
4.3. Concordancia entre la muestra de FCG y saliva para la detección de bacterias periodontopatógenas	109
<b>5. Asociación entre los parámetros clínicos y microbiológicos</b>	113
<b>6. Asociación entre patógenos en muestras de FCG y saliva</b>	121
6.1. Asociación CMV-VEB	121
6.2. Asociación entre el VEB y bacterias periodontopatógenas	121
6.3. Asociación entre bacterias periodontopatógenas	122
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	127
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	157
<b>IX. REFERENCIAS</b>	161
<b>X. ANEXO: Summary</b>	195



# ABREVIATURAS

---



## ABREVIATURAS

- AAP:** Academia Americana de Periodoncia
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ADNc:** ADN complementario monocatenario
- AP-PCR:** PCR con cebadores arbitrarios (*Arbitrally Primed PCR*)
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- BOP:** Índice de sangrado al sondaje
- CMV:** Citomegalovirus
- Ct:** Ciclo umbral (*threshold cycle*)
- DE:** Desviación estándar
- dNTP:** Desoxirribonucleótido trifosfato
- EBNA:** Antígeno nuclear de VEB (*Epstein-Barr Virus-associated Nuclear Antigens*)
- ELISA:** Enzimoinmunoensayo
- FCG:** Fluido crevicular gingival
- H<sub>0</sub>:** Hipótesis nula
- H<sub>1</sub>:** Hipótesis alternativa
- IC:** Intervalo de confianza
- IFD:** Inmnofluorescencia directa
- IFI:** Inmunofluorescencia indirecta
- IFN:** Inmunofeón
- IgG:** Inmunoglobulina G
- IgM:** Inmunoglobulina M
- IL:** Interleuquina
- IP:** Índice de placa
- IR:** Región interna repetitiva
- kpb:** Kilopares de bases
- LMA:** Late membrane antigens
- LMP:** Latent membrane protein
- LOD:** Límite de detección (*limit of detection*)
- log:** Logaritmo decimal en base 10
- LPS:** Lipopolisacárido
- MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad (*Major histocompatibility complex*)



**MMPs:** Metaloproteinasas de la matriz

**n/a:** No se aplica

**n/d:** No disponible

**NK:** Célula *Natural Killer*

**NIC:** Nivel de inserción clínico

**OR:** Odds ratio

**ORF:** Fragmento abierto de lectura (*Open reading frame*)

**ORI:** Origen de replicación

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

**PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina E<sub>2</sub>

**PMN:** Leucocito polimorfonuclear neutrófilo

**PS:** Profundidad de sondaje

**RT-PCR:** PCR de transcripción inversa (*Reverse transcriptase PCR*)

**SIDA:** Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

**TGF:** Factor de crecimiento transformante

**TLR:** Receptor Toll-Like

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**TR:** Región terminal repetitiva

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

**VCA:** Antígeno de la cápside de VEB (*viral capsid antigen*)

**VEB:** Virus de Epstein-Barr

**VHH-6:** Virus herpes humano 6

**VHH-7:** Virus herpes humano 7

**VHS-1:** Virus herpes simple 1

**VHS-2:** Virus herpes simple 2

**VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana

**VVZ:** Virus varicela-zóster

# RESUMEN

---



## RESUMEN

En los últimos 15 años, se ha sugerido que ciertos herpesvirus, en particular, el citomegalovirus (CMV) y el virus de Epstein-Barr (VEB), podrían tener cierto papel en el inicio y progresión de las enfermedades periodontales. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos, no se han podido obtener resultados concluyentes.

Por otro lado, aunque el método de referencia actual para el estudio microbiológico de los patógenos periodontales es la toma de muestras en fluido crevicular gingival (FCG), se ha propuesto a la saliva como método diagnóstico alternativo, dadas sus ventajas en la sencillez y rapidez en la toma.

Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la prevalencia del CMV y del VEB, así como la posible asociación de estos virus con cinco bacterias periodontopatógenas (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*) en muestras de FCG y saliva, en sujetos con periodontitis crónica y en controles sanos. Por otro lado, se quería estudiar la asociación entre estos patógenos con los parámetros clínicos de enfermedad, tanto en FCG y saliva. Por último, se pretendía determinar la concordancia entre la muestra de FCG y saliva para la detección de estos microorganismos, a fin de constatar la utilidad de la saliva como método diagnóstico alternativo a la toma en FCG.

Se realizó un estudio epidemiológico clínico y microbiológico transversal, con un diseño de casos-contróles, constituido por 24 pacientes diagnosticados de periodontitis crónica generalizada moderada (grupo periodontitis crónica) y por 24 individuos periodontalmente sanos (grupo control). Se realizó un examen periodontal a todos los sujetos, registrando: índice de placa, profundidad de sondaje, nivel de inserción clínico y sangrado al sondaje. Se tomaron muestras de FCG y saliva. Para la detección de ADN de CMV y VEB se efectuó una PCR en tiempo real, mientras que para la detección del ADN de las cinco bacterias patógenas se empleó una PCR múltiple seguida por hibridación reversa.

La prevalencia encontrada de ADN de CMV y VEB, mediante PCR en tiempo real, en nuestra población de estudio, es baja. No se ha detectado ADN de CMV en ningún sujeto, tanto en muestras de FCG como en saliva. Respecto al VEB, no se han

observado diferencias estadísticamente significativas en frecuencia de detección entre grupo periodontitis crónica (FCG: 0%; saliva: 12.5%) y el grupo control (FCG: 4.2%; saliva: 20.8%).

No se han observado asociaciones entre el CMV y el VEB, y entre estos dos virus con las bacterias analizadas. Sin embargo, en FCG todas las bacterias están asociadas entre sí, a excepción de *A. actinomycetemcomitans*. En saliva, únicamente *T. denticola* está relacionada con *P. gingivalis* y *T. forsythia*.

En FCG, la presencia de VEB se asocia con un índice de placa bajo, mientras que la detección de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola* se relaciona con mayores valores de índice de placa, profundidad de sondaje, nivel clínico de inserción y sangrado al sondaje. En saliva, solo *P. gingivalis* y *T. denticola* se asocian con los parámetros clínicos evaluados.

La concordancia entre la muestra de FCG y saliva para la detección *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* es alta; moderada para *T. denticola*; baja para *P. intermedia*, y muy baja para VEB y *T. forsythia*. Por tanto, empleando técnicas de PCR, la saliva podría emplearse como método diagnóstico alternativo a la toma de muestra de FCG para la detección de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. denticola*, no aconsejándose para la determinación de VEB, *P. intermedia*, *T. forsythia*.

**PALABRAS CLAVE:** herpesvirus, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, periodontitis, saliva.

# I. INTRODUCCIÓN

---



## **1. ENFERMEDADES PERIODONTALES**

Las enfermedades periodontales son patologías inflamatorias crónicas inducidas por las bacterias del biofilm dental (placa bacteriana) y que afectan al periodonto. Estas enfermedades engloban a dos grupos de patologías bien diferenciadas, las gingivitis y las periodontitis. A diferencia de las gingivitis, en las periodontitis se produce la destrucción de los tejidos de soporte del diente (periodonto) y, en última instancia, puede dar lugar a movilidad y pérdida dentaria (Socransky y Haffajee, 1992).

Además de afectar a una parte importante de la población, estas patologías pueden tener influencia en la vida de los pacientes. Las alteraciones de funcionalidad (dificultad en la masticación y fonética) y estéticas (alargamiento de los dientes, migración de los mismos, ausencias dentarias, aparición de espacios negros, etc.) que se producen por las enfermedades periodontales, conllevan una pérdida en la calidad de vida de las personas que las padecen (McGrath y Bedi, 2001; McGrath y Bedi, 2004; Needleman et al., 2004; Brunsvold, 2005).

Por otra parte, cada vez cobra mayor relevancia la repercusión de las enfermedades periodontales sobre ciertas condiciones sistémicas. Diversos estudios implican a la infección periodontal como un factor de riesgo para algunas patologías sistémicas, como las enfermedades cardiovasculares, alteraciones en el adecuado control de la diabetes, ciertas enfermedades respiratorias, obesidad y síndrome metabólico o recién nacidos prematuros y/o con bajo peso al nacer (Dietrich et al., 2013; Ide y Papapanou, 2013; Linden et al., 2013; Madianos et al., 2013; Schenkein y Loss, 2013; Taylor et al., 2013). El establecimiento de una relación bidireccional entre la periodontitis y algunas de estas patologías, hace que se aumente la necesidad de realizar un adecuado diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad.

### **1.1. Epidemiología**

Las patologías periodontales son enfermedades con una elevada prevalencia y distribución mundial. La gingivitis moderada es bastante común y la mayoría de los adultos presentan algún diente con pérdida de inserción periodontal y de soporte óseo. Sin embargo, solo un pequeño porcentaje de la población, en cualquier cohorte de edad, padece formas avanzadas de la enfermedad, generalmente localizada en pocos dientes y aumentando esta proporción con la edad (Dye, 2012).



Los últimos estudios epidemiológicos evidencian una tendencia a la alza de las tasas de periodontitis en sujetos adultos con acceso a cuidados bucodentales (Köning et al., 2010; Eke et al., 2012). En Estados Unidos, las cifras citan una prevalencia de periodontitis del 47%, con más de un 80% de los casos con periodontitis moderada o avanzada (Eke et al., 2012). Los estudios epidemiológicos realizados en Europa muestran que alrededor del 30.5% de los adultos presenta sondajes superiores a 4-5 mm, y hasta un 71.4% de la población de entre 65 y 74 años presenta pérdida de inserción mayor o igual a 6 mm (Köning et al., 2010).

Respecto a la población española, la encuesta realizada en 2010 revela que el 20% de los adultos jóvenes (35-44 años) presentan pérdida de inserción de 4-5 mm, y el 6% mayor o igual a 6 mm. En el grupo de 65-74 años, el 26.8% tienen pérdida de inserción de 4-5 mm y el 17.7% de más de 6 mm (Llodra Calvo, 2012). En este sentido, las cifras reportadas en las encuestas llevadas a cabo en España en los últimos años ponen de manifiesto una disminución en el índice periodontal comunitario en los adultos jóvenes con el paso de los años (Llodra Calvo, 2012). De hecho, en los adultos jóvenes, los datos de hace 20 años mostraban una prevalencia de bolsas periodontales alrededor del 49%, valor que descendió hasta un 26% en el año 2000, a un 25.4% en el año 2005, y a un 16% en 2010 (Noguerol et al., 1995; Llodra Calvo et al., 2002; Bravo Pérez et al., 2006; Llodra Calvo, 2012). Aún así, teniendo cuenta que más de la mitad de los sujetos españoles presenta cálculo subgingival, si sumamos los pacientes con bolsas, de mayor o menor profundidad, se estima que más del 30% de la población española padece algún grado de patología periodontal (Llodra Calvo, 2012).

## **1.2. Etiología y factores de riesgo**

En la mayor parte de los casos, la periodontitis viene precedida de la gingivitis, y su progresión hacia la pérdida ósea y la pérdida de inserción está modulada por factores microbiológicos e inmunológicos (Socransky et al., 1984). De hecho, la periodontitis se considera como una enfermedad inflamatoria crónica causada por microorganismos que habitan en el biofilm subgingival, y que requieren un huésped susceptible para poner en marcha la reacción inflamatoria crónica que origina la destrucción periodontal (Kornman et al., 1997a). Los estudios epidemiológicos sugieren que la destrucción periodontal no es consecuencia inevitable de la gingivitis y, por tanto, es necesario

profundizar más en el estudio de las características que hacen que algunos individuos sean más susceptibles a la periodontitis (Baelum et al., 1988).

### 1.2.1. Patógenos periodontales

Se estima que más de 700 especies diferentes de microorganismos son capaces de colonizar la cavidad bucal. Los recuentos bacterianos del surco gingival varían desde  $10^3$ , en surcos gingivales sanos, hasta  $>10^8$ , en bolsas periodontales profundas, pudiendo alcanzar hasta  $10^9$  (Haffajee y Socransky, 2006a). A este número hay que sumar todas las especies que no podemos cultivar o que son difíciles de identificar.

Para considerar a una bacteria como un patógeno periodontal, es decir, involucrada en el inicio y progresión de la periodontitis, debe cumplir una serie de condiciones, definidas inicialmente por los postulados de Kock. En la actualidad, estos postulados han sido ampliados y modificados, y se conocen como criterios de Socransky, e incluyen (Socransky y Haffajee, 1992; Socransky y Haffajee, 1997):

1. **Criterio de asociación:** la especie causante de la enfermedad debe hallarse con mayor frecuencia y en mayores cantidades en los individuos enfermos, respecto de los individuos sin enfermedad o con diferentes formas de la misma.
2. **Criterio de eliminación:** la eliminación de la especie debe asociarse a la remisión de la enfermedad. La evaluación de este criterio presenta una serie de dificultades, puesto que la terapia normalmente no es suficientemente selectiva como para eliminar una sola especie.
3. **Criterio de respuesta del huésped:** cuando una especie es capaz de producir daños en el organismo, parece plausible que el huésped deba producir, bien anticuerpos específicos, o una respuesta celular inmune contra el agente patógeno.
4. **Criterio de los factores de virulencia:** la especie en cuestión debe manifestar mecanismos adecuados para colonizar al huésped, evadir sus defensas y producir daño tisular, bien directamente o mediante la producción de metabolitos dañinos.
5. **Criterio de estudios en animales:** la implantación de la especie en modelos animales debe producir enfermedad.

- 6. Criterio de análisis de riesgo:** los estudios prospectivos deben demostrar el riesgo que supone para la progresión de la enfermedad la presencia de la especie.

En 1996, en el Taller Mundial de Periodoncia, se evaluó toda la literatura disponible sobre los diversos microorganismos, y basándose en estos criterios, se clasificaron como patógenos con fuerte evidencia de asociación a las periodontitis, las especies *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (antes denominada *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* (antes denominada *Tannerella forsythensis*); con evidencia moderada, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra* (antes denominada *Micromonas micros*), *Streptococcus intermedius*, *Treponema denticola* y *espiroquetas*. Con ligera evidencia de asociación, se consideraron a *Eikenella corrodens*, bacilos entéricos, *Pseudomonas sp.*, *Selenomonas sp.*, *Staphylococcus sp.*, y hongos (Zambon, 1996a).

A partir de los años 1990, gracias al desarrollo y perfeccionamiento del microscopio confocal de láser, se ha obtenido un mejor conocimiento de la placa dental y de su estructura, desarrollándose el modelo de la placa dental como biofilm (Marsh y Bradshaw, 1995; Marsh, 1997). Un biofilm es una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se hallan unidas a un sustrato o superficie, o unas a otras, embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes (Donlan y Costerton, 2002). El comportamiento de las bacterias en los biofilms es totalmente diferente a su comportamiento en solitario y, tanto su patogenicidad como la expresión de sus factores de virulencia pueden estar aumentados o ser distintos (Socransky y Haffajee, 2002).

### **1.2.2. Respuesta del huésped**

La respuesta del hospedador frente a la agresión bacteriana se va a traducir en una respuesta inflamatoria e inmune. Aunque estas respuestas parecen similares a las que ocurren en otros tejidos del organismo, existen claras diferencias, tanto por la existencia del epitelio de unión, con sus peculiares características, y por el biofilm subgingival,

con una gran cantidad de bacterias y sus productos, con potenciales inductores de respuestas diferentes.

Aunque los microorganismos presentes en el biofilm, y los componentes bioquímicos producidos por ellos, son considerados factores de iniciación de la lesión periodontal, el huésped desempeña un papel esencial en la progresión y severidad de las enfermedades periodontales (van Dyke y Sheileh, 2005; Schenkein, 2006). Los eventos moleculares y celulares que ocurren inicialmente frente a dicha agresión, se deben a una respuesta inflamatoria e inmune “rutinaria” del hospedador frente al biofilm subgingival. Esta respuesta, si es adecuada, debería controlar los antígenos potencialmente dañinos de estos patógenos. Si es deficiente, puede derivar en un balance positivo para los microorganismos, dando lugar a pérdida de inserción. De la misma forma, si es exagerada, puede llevar a una sobreproducción de citoquinas y de otros mediadores inflamatorios, cuyo resultado conduciría a la destrucción celular y tisular, involucrando al tejido conectivo y óseo (Page y Kornman, 1997). Tanto la respuesta inflamatoria inmune y la destrucción tisular están influenciadas por factores de riesgo genéticos, ambientales y adquiridos (Kinane et al., 2009; Cekici et al., 2014).

Las bacterias que componen el biofilm liberan grandes cantidades de metabolitos que difunden a través del epitelio de unión. Entre ellos, se incluyen ácidos grasos tales como el butírico y el propiónico, que son tóxicos para los tejidos; péptidos del tipo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina, que son potentes quimioatrayentes para los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN); y los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias Gram-negativas. De esta forma, las células del epitelio de unión sintetizan mediadores inflamatorios, como interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y metaloproteinasas de la matriz (MMPs), que pueden atravesar el epitelio de unión y entrar en el tejido conectivo. A través de este mecanismo, los vasos se inflaman y se establece un gradiente quimiotáctico que permite la migración de los PMN hacia la localización de la placa microbiana, formando una barrera entre ella y el tejido gingival (Kornman et al., 1997b). Los PMN poseen mecanismos antimicrobianos altamente especializados que forman la primera línea de defensa frente a las bacterias. Además, secretan mediadores quimiotácticos y vasoactivos que perpetúan la respuesta inflamatoria del huésped (neutrofil-elastasa,  $\beta$ -glucoronidasa y leucotrieno B<sub>4</sub>).

Por otro lado, como consecuencia del ataque bacteriano, los macrófagos se activan a través de mecanismos no-antígeno específicos, aumentando la respuesta inflamatoria e iniciando la respuesta inmune. Los macrófagos expuestos a LPS producen varias citoquinas, entre las que se encuentran el interferón  $\gamma$ , el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, MMPs y PGE<sub>2</sub>. Algunos de los factores liberados por los monocitos, en particular la IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y la PGE<sub>2</sub>, son componentes fundamentales de las lesiones de periodontitis y han sido implicados en la patogénesis de las enfermedades periodontales (Kornman et al., 1997b; Cekici et al., 2014).

### **1.2.3. Genética**

Los factores genéticos modifican la respuesta del individuo frente a las agresiones microbiológicas y pueden contribuir a variaciones en la prevalencia, tasa de progresión y severidad de las enfermedades periodontales (Borrel y Papapanou, 2005; Shapira et al., 2005; Laine et al., 2012; Schaefer et al., 2013). Así, ciertas enfermedades de base genética presentan manifestaciones periodontales, como la neutropenia o el síndrome de Papillon-Lefèvre.

En este sentido, se han estudiado diversos polimorfismos genéticos asociados a un mayor riesgo de padecer periodontitis (Albandar y Rams, 2002; Borrel y Papapanou, 2005), como en la síntesis de diversas citoquinas inflamatorias: IL-1 (Kornman et al., 1997a; Karimbux et al., 2012; Zeng et al., 2015), TNF- $\alpha$  (Ding et al., 2014), IL-2 (Scarel-Caminaga et al., 2003), IL-4 (Scarel-Caminaga et al., 2003; Gonzales et al., 2004), IL-6 (Franch-Chillida et al., 2010) e IL-10 (Kinane et al., 1999; Gonzales et al., 2002; Passoja et al., 2010). Asimismo, se han evaluado los polimorfismos en la expresión de determinados receptores: receptor para la vitamina D (Chen et al., 2012), receptor gamma RII de los PMN para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas G (Wolf et al., 2006) y del receptor fMLP (n-Formil-1-metionil-1-leucil-1-fenilalanina) de los PMN (Maney y Walters, 2009). También se han investigado los polimorfismos en la síntesis de ciertas enzimas, como N-acetil transferasa (NAT2) (Meisel et al., 2000; Kocher et al., 2002) o en la expresión de mediadores de destrucción tisular, como MMPs 1 y 3 (Astolfi et al., 2006; Li et al., 2013).

#### **1.2.4. Factores de riesgo**

Aunque las enfermedades periodontales están originadas por los microorganismos presentes en el biofilm oral, existen una serie de factores que influyen en el desarrollo de las mismas (Salvi et al., 1997; Albandar y Rams, 2002; Genco y Borgnakke, 2013).

Dentro de los factores de riesgo locales, se han descrito la placa bacteriana, herpesvirus, cálculo, contactos dentales abiertos, afectación de furca, impactación alimentaria, además de oclusión traumática y presencia de hábitos parafuncionales (Salvi et al., 1997; Albandar y Rams, 2002; Genco y Borgnakke, 2013).

Respecto a los factores de riesgo ambientales, destacan el tabaquismo, la diabetes, factores psicosociales como el estrés, obesidad, osteoporosis/osteopenia, raza/étnia, sexo, estatus socioeconómico, bajo nivel educacional, cuidados dentales infrecuentes y el aumento de edad (Salvi et al., 1997; Albandar y Rams, 2002; Genco y Borgnakke, 2013).

##### **1.2.4.1. Tabaco**

Se ha observado que la prevalencia de periodontitis es mayor en fumadores (Bergström y Eliasson, 1987; Bergström, 1989; Bergström y Preber, 1994). Su consumo está relacionado con un riesgo cinco veces mayor de padecer periodontitis (Bergström et al., 1991) y sus efectos nocivos parecen ser dosis dependientes (Grossi et al., 1994; Grossi et al., 1995). Además, la respuesta a los tratamientos periodontales es peor en los pacientes fumadores (Ah et al., 1994; Tonetti et al., 1998; Papantonopoulos, 1999; Heasman et al., 2006; Patel et al., 2012; Rosa et al., 2014; Nociti et al., 2015).

Se han propuesto diferentes mecanismos por los que el tabaco puede tener efecto en las enfermedades periodontales, como la disminución en los niveles plasmáticos de inmunoglobulina G2 (IgG2) o la alteración en la función de los PMN (Kinane y Chestnutt, 2000; Granswinkel et al., 2004; Palmer et al., 2005). También se ha observado que produce cambios en la microflora oral (Zambon et al., 1996b; Kamma et al., 1999; van Winkelhoff et al., 2001; Delima et al., 2010). Su consumo produce alteraciones en la cicatrización, en el sistema inmune y en la respuesta inflamatoria (Rivera-Hidalgo, 1986; Apatzidou et al., 2005; Nociti et al., 2015).

#### **1.2.4.2. Diabetes**

Diversos estudios evidencian que los sujetos con diabetes (tipo I y tipo II) mal controlada y de larga duración presentan una tasa de riesgo dos a tres veces mayor de padecer enfermedad periodontal que los no diabéticos (Salvi et al., 1997), así como una alta prevalencia de bolsas profundas y pérdida ósea (Hugoson et al., 1989; Emrich et al., 1991; Thorstensson y Hugoson, 1993; Lalla et al., 2000; Chapple y Genco, 2013; Taylor et al., 2013). También se ha observado una relación dosis-respuesta entre un peor control metabólico y la severidad de la afectación periodontal (Tervonen et al., 1997; Taylor et al., 1998; Chapple y Genco, 2013; Taylor et al., 2013).

#### **1.2.4.3. Estrés**

Estudios experimentales y clínicos han mostrado que el estrés crónico y ciertos estados emocionales depresivos pueden alterar el sistema inmunológico del huésped y contribuir a la destrucción de los tejidos periodontales (Kamma y Baehni, 2003; Peruzzo et al., 2007; Bailey et al., 2009; Warren et al., 2014) e, incluso, influir en los resultados del tratamiento periodontal (Elter et al., 2002; Kamma y Baehni, 2003).

Aunque existe una fuerte evidencia de asociación entre el estrés y la aparición de gingivitis necrotizante (Pindborg, 1951; Johnson y Engel, 1986; Horning y Cohen, 1995; Minneman et al., 1995), no hay suficiente evidencia científica para relacionar el estrés con las enfermedades periodontales (Salvi et al., 1997; Heitz-Mayfield, 2005; Peruzzo et al., 2007; Warren et al., 2014), por lo que se consideraría un indicador de riesgo de estas enfermedades, a la espera de realizarse más estudios longitudinales que puedan demostrar dicha asociación (Salvi et al., 1997). Hay que tener en cuenta que los individuos con estrés y depresión también pueden presentar mayor riesgo de periodontitis debido a que suelen mostrar comportamientos asociados con conductas no saludables, como hábitos higiénicos inadecuados, dietas cariogénicas, etc. (Warren et al., 2014).

#### **1.2.4.4. Otros factores ambientales**

Se ha observado una asociación positiva entre la obesidad y las enfermedades periodontales, tanto en estudios de casos y controles (Saito et al., 2001; Al Zahrani et

al., 2003; Wood et al., 2003; Dalla Vecchia et al., 2005; Saito et al., 2005) como en estudios longitudinales (Morita et al., 2011; Gorman et al., 2012a; Gorman et al., 2012b). Las revisiones sistemáticas realizadas por Keller et al. (Keller et al., 2015) y Nascimento et al. (Nascimento et al., 2015) muestran que la prevalencia y la severidad de la enfermedad periodontal es mayor en sujetos con obesidad.

Los mecanismos biológicos implicados en la relación entre la obesidad y un mayor riesgo de padecer enfermedades periodontales serían: un estado hiperinflamatorio, metabolismo de los lípidos alterado y una mayor resistencia periférica a la insulina (Saito et al., 1998; Nishimura y Murayama, 2001; Genco et al., 2005). A pesar de estos resultados, son necesarios más estudios longitudinales y transversales que confirmen esta asociación.

También se ha expuesto cierta relación entre el consumo de altas cantidades de alcohol y las enfermedades periodontales. Aunque existen estudios transversales (Tezal et al., 2004) y estudios prospectivos (Pitiphat et al., 2003) que afirman dicha asociación, la evidencia científica disponible aún no es suficiente (Jansson, 2008; Amaral et al., 2009; Park et al., 2014).

### **1.3. Clasificación de las enfermedades periodontales**

La clasificación de las enfermedades periodontales que se emplea en la actualidad es la introducida en el año 1999 por la Academia Americana de Periodoncia (AAP) en el *International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions* (Armitage, 1999) (Tabla 1).

En esta clasificación, a diferencia de las anteriores, se elimina cualquier dato relacionado con la edad y la tasa de progresión de la enfermedad. Así, todos aquellos casos en los que no existe una destrucción agresiva de los tejidos periodontales, independientemente de la edad, se les agrupa como periodontitis crónica, subclasificándose a su vez en generalizada o localizada, según la extensión de la afectación.

Por otro lado, las formas de enfermedad periodontal claramente destructivas se denominan periodontitis agresivas, subclasificándose también en generalizada o



localizada. En este último apartado se incluyen las periodontitis anteriormente conocidas como prepuberal y juvenil, excepto aquellas clasificadas actualmente como periodontitis asociadas a enfermedades sistémicas.

**Tabla 1. Clasificación de las enfermedades periodontales. *International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions, 1999***

<b>PERIODONTITIS CRÓNICA</b>	Localizada Generalizada
<b>PERIODONTITIS AGRESIVA</b>	Localizada Generalizada
<b>PERIODONTITIS COMO MANIFESTACIÓN DE ENFERMEDADES SISTÉMICAS</b>	
Asociado con enfermedades hematológicas	Neutropenia adquirida Leucemias Otros
Asociado con desórdenes genéticos	Neutropenia cíclica y familiar Síndrome de Down Síndromes de deficiencias en la adhesión leucocitaria Síndrome de Papillon-Lefèvre Síndrome de Chediak-Higashi Síndrome de Histiocitosis Enfermedad de almacenamiento del glicógeno Agranulocitosis genética infantil Síndrome de Cohen Síndrome de Ehlers-Danlos (tipo IV y VIII) Hipofosfatasa Otros
Otros no especificados	
<b>ENFERMEDADES PERIODONTALES NECROTIZANTES</b>	Gingivitis ulceronecrotizante Periodontitis ulceronecrotizante
<b>ABSCESOS DEL PERIODONTO</b>	Absceso gingival Absceso periodontal Absceso pericoronario
<b>PERIODONTITIS ASOCIADAS CON LESIONES ENDODÓNTICAS</b>	
<b>DEFORMIDADES O CONDICIONES ADQUIRIDAS O DEL DESARROLLO</b>	
Factores locales dentarios que modifican o predisponen a las enfermedades gingivales asociadas a placa / periodontitis	Factores anatómicos dentarios Restauraciones dentarias Fracturas radiculares Reabsorciones radiculares cervicales y perlas del esmalte
Deformidades o condiciones mucogingivales alrededor de los dientes	Recesiones gingivales / tejido blando Ausencia de encía queratinizada Ausencia de profundidad de vestíbulo Posición aberrante del frenillo / músculo Exceso gingival <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pseudobolsas</li> <li>- Margen gingival inconsistente</li> <li>- Excesivo margen gingival</li> <li>- Agrandamiento gingival</li> </ul> Alteración del color
Deformidades o condiciones mucogingivales en tramos desdentados	Defectos verticales / horizontales de la cresta ósea Ausencia de tejido gingival queratinizado Agrandamiento gingival / tejido blando Posición aberrante del frenillo / músculo Ausencia de profundidad de vestíbulo Alteración del color
Trauma oclusal	Trauma oclusal primario Trauma oclusal secundario

## 2. FAMILIA *HERPESVIRIDAE*

### 2.1. Clasificación y nomenclatura

La familia *Herpesviridae* incluye alrededor de 100 virus diferentes, aunque solamente ocho infectan al ser humano de forma natural. Dentro de esta familia, se han descrito tres subfamilias con varias especies agrupadas (Tabla 2): la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, que incluye los virus herpes simple 1 (VHS-1) y 2 (VHS-2) y el virus varicela-zóster (VVZ). La subfamilia *Betaherpesvirinae*, comprende a los virus herpes humanos 6 y 7 (VHH-6 y 7) y el citomegalovirus (CMV) humano o virus herpes humano 5. Por último, la subfamilia *Gammapherpesvirinae*, constituida por el virus herpes humano 8 (VHH-8) y por el virus de Epstein-Barr (VEB) o herpesvirus humano 4 (VHH-4). Un noveno virus herpes, el virus del herpes B o *Herpesvirus simiae*, infecta en condiciones naturales a macacos, aunque puede causar encefalitis mortal en los seres humanos (Pellet y Roizman, 2007).

La clasificación en las tres subfamilias está basada fundamentalmente en diferencias en las características biológicas. En lo que se refiere al tipo celular en el que se establece la infección latente, los *Alphaherpesvirinae* permanecen latentes en tejido nervioso (ganglios sensoriales, neuronas), en tanto que los miembros de la subfamilia *Betaherpesvirinae* en células linforreticulares y, probablemente, en muchos otros tejidos. Los miembros de la subfamilia *Gammapherpesvirinae* lo hacen en linfocitos B o T, células epiteliales y fibroblastos. En el caso del VEB, está claro que el estado latente se produce en linfocitos B, mientras que el CMV, aunque no se conoce del todo, parece que permanece latente en glándulas secretoras, células linforreticulares y posiblemente en cualquiera de los tejidos en que produce infección (Pellet y Roizman, 2007).

Por otra parte, mientras que los *Alphaherpesvirinae* muestran un ciclo reproductivo corto, rápida diseminación en cultivo y destrucción eficiente de las células infectadas, los *Betaherpesvirinae* tienen un ciclo replicativo largo y la infección célula a célula en cultivo es lenta, produciendo agrandamiento de las células infectadas (citomegalia) (Pellet y Roizman, 2007).

**Tabla 2. Características de la familia *Herpesviridae***

Subfamilia	Género (especie)	Infección primaria	Otras enfermedades	Latencia
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i> (VHS-1)	Gingivostomatitis	Fiebre, ampollas, encefalitis, retinitis	Neuronas
	<i>Simplexvirus</i> (VHS-2)	Herpes genital	Encefalitis	Neuronas
	<i>Varicellovir</i> (VVZ)	Varicela	Herpes-zóster, encefalitis	Neuronas
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i> (CMV)	Mononucleosis	Retinitis, neumonía	Monocitos, epitelio
	<i>Roseolovirus</i> (VHH-6A y 6B)	Exantema súbito	Hepatitis, encefalitis	Monocitos, células T
	<i>Roseolovirus</i> (VHH-7)	Exantema súbito	-	Monocitos, células T
<i>Gammapherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i> (VEB)	Mononucleosis infecciosa	Algunos tumores	Células B
	<i>Rhadinovirus</i> (VHH-8)	-	Sarcoma de Kaposi, algunos tumores	Desconocido

VHS: virus herpes simple; VVZ: virus varicela-zóster; CMV: citomegalovirus;

VHH: virus herpes humano; VEB: virus de Epstein-Barr.

Modificado de: Slots, 2005

## 2.2. Estructura

En lo relativo a su estructura, se trata de virus grandes (120-300 nm de diámetro) constituidos, de fuera hacia dentro por (Pellet y Roizman, 2007):

- Una envuelta o membrana, adquirida de la membrana nuclear de la célula huésped, de la que protruyen unas proyecciones espiculadas hacia el exterior constituidas por glicoproteínas. Estas protrusiones desempeñan un papel fundamental durante las primeras fases de la replicación viral.
- El tegumento, alrededor de la nucleocápside, que es un material amorfo compuesto de una o más proteínas codificadas por el virus.
- Una cápside, que junto con el core, forma la nucleocápside. La cápside está formada por 162 capsómeros proteicos en una disposición icosapentahédrica.

- Una región central, core o nucleoide, que contiene el genoma viral, constituido por una molécula de ADN lineal y bicatenario.

Además de la arquitectura del virión, primera característica en que se basa la inclusión de un virus en esta familia, todos los herpesvirus conocidos comparten una serie de características biológicas (Pellet y Roizman, 2007):

- Especifican enzimas y otros factores implicados en la síntesis y metabolismo de ácidos nucleicos (ADN polimerasa, helicasa, primasa, timidín-kinasa, ribonucleótido reductasa) y procesamiento de proteínas (proteín-kinasas, etc.).
- La síntesis de ADN viral, así como el ensamblaje de las cápsides, tiene lugar en el núcleo, y la adquisición de la envuelta es a través de la membrana nuclear.
- La producción de virus infeccioso está acompañada de muerte celular irreversible.
- Son capaces de establecer infección latente. En las células que contienen virus en estado latente, los genomas virales toman la forma de moléculas circulares cerradas, expresando solo una pequeña parte de los genes virales.

### **2.3. Ciclo infectivo**

Todavía se desconoce mucho del ciclo infectivo de los virus herpes, sobre todo en cuanto a las proteínas que intervienen en cada fase. Con las variaciones propias de cada uno de los virus herpes, la replicación es un proceso regulado cuidadosamente y con múltiples etapas (Pellet y Roizman, 2007):

#### ***a. Unión***

La infección de los herpesvirus comienza con la interacción de las glicoproteínas de la envuelta viral con receptores de la membrana celular. Para un gran número de miembros de esta familia, inicialmente se produce una interacción electrostática inespecífica del virión con el principal proteoglicano de la superficie celular, el heparán sulfato, seguida por la unión de glicoproteínas virales de la envuelta a uno o varios receptores específicos.

***b. Entrada y desensamblaje***

Tras la unión a los receptores específicos, se produce la fusión de la envuelta viral con la membrana plasmática celular, lo que permite la liberación de la nucleocápside al citoplasma. La cápside, junto con parte del tegumento, es transportada por el citoesqueleto hasta el complejo del poro nuclear, donde se abre e inyecta el genoma viral al interior del núcleo. Una vez allí, el ADN viral lineal se circulariza y la replicación del ADN puede comenzar.

***c. Expresión génica (transcripción, replicación y ensamblaje)***

En el núcleo es donde ocurre la mayor parte del ciclo vital de los herpesvirus (incluyendo transcripción, replicación del ADN y ensamblaje de las cápsides).

La transcripción de los genes virales se lleva a cabo por la ARN polimerasa II celular, pero con la intervención de factores transcripcionales codificados por el virus en todos los estadios del ciclo de infección, los cuales modulan la actividad de la polimerasa celular y determinan el reconocimiento ordenado de los motores virales por los complejos de transcripción. De esta forma, la replicación prosigue mediante un patrón ordenado y secuencial de expresión génica viral. Los primeros genes en expresarse son los genes inmediato-tempranos (denominados  $\alpha$ ), los cuales codifican las proteínas que regulan la expresión de genes virales.

***d. Replicación, maduración, salida***

A continuación, se induce la transcripción de los genes tempranos (denominados  $\beta$ ), que codifican proteínas que intervienen preferentemente en la replicación viral, tales como la ADN polimerasa, la helicasa o la timidina quinasa.

Tras la replicación del ADN viral, los genes tardíos (llamados  $\gamma$ ) son transcritos, codificando en su mayoría proteínas estructurales. Los productos de estos genes “tardíos” se incorporan en los viriones hijos o ayudan en su ensamblaje.

Las nucleocápsides de los herpesvirus se ensamblan en el núcleo y se rodean de la membrana interna nuclear, donde previamente se han insertado proteínas codificadas por el virus. A continuación, se desprenden de la envoltura en la membrana nuclear

externa y se vuelven a cubrir de envoltura en la membrana citoplasmática, tras lo cual, salen de la célula huésped y rápidamente infectan a células susceptibles contiguas. La forma predominante de expansión de los herpesvirus en el organismo es célula a célula, ya que no se acumulan virus libres.

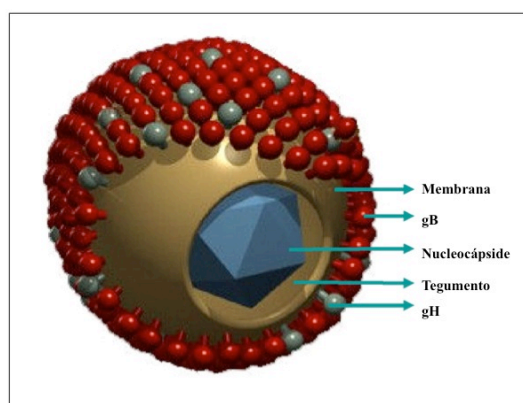
A continuación, se describirán más detalladamente las características y manifestaciones clínicas de CMV y VEB, agentes que nos ocupan en este trabajo.

## 2.4. Citomegalovirus humano

### 2.4.1. Estructura

El CMV es uno de los virus de mayor tamaño que infectan al ser humano. Los estudios de seroprevalencia confirman que al menos un 70% de la población en los países desarrollados y más del 90% en los subdesarrollados ha sido infectada por el virus, generalmente durante la infancia (Staras et al., 2008; Cannon et al., 2010).

El CMV tiene una arquitectura similar a la del resto de los herpesvirus. De fuera hacia dentro, posee una membrana lipoproteica de la que protuyen una proyecciones espiculadas hacia el exterior, constituidas por glicoproteínas. Así, se sabe que las glicoproteínas gB y gH desempeñan un papel fundamental durante la fase de unión y penetración del CMV a la célula huésped (Simmen et al., 2001; Mocarski et al., 2007). A continuación, se encuentra el tegumento, que es una estructura proteica situada entre la nucleocápside y la envuelta, compuesta por más de 20 fosfoproteínas, siendo las más importantes pp150 y pp65. Por último, envolviendo al ADN viral, se encuentra la cápside, de simetría icosaédrica, formada por 162 capsómeros (Mocarski et al., 2007) (Figura 1).

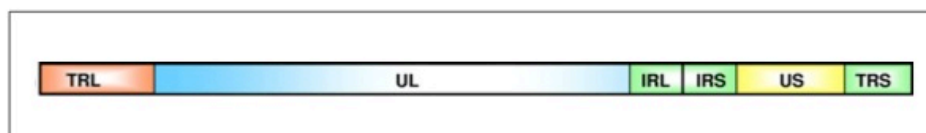


**Figura 1. Estructura del citomegalovirus.**

Tomado de: Crough y Khanna, 2009

El genoma del CMV, al igual que el del resto de herpesvirus, está constituido por una doble cadena de ADN de morfología lineal, de unas 230-240 kpb. Está compuesto, en un 57% por guanina y citosina, siendo el de mayor tamaño entre los *Herpesviridae*.

El genoma está organizado en dos fragmentos: un fragmento largo (L) y un fragmento corto (S) unidos de forma covalente. Cada fragmento está constituido por una secuencia única (U) de ADN flanqueada en el extremo externo por una secuencia repetida terminal (TR) y en el extremo interno por una secuencia repetida interna (IR). Las secuencias  $U_L$  y  $U_S$ , comprendidas entre las secuencias repetitivas, contienen la práctica totalidad de genes virales (Mocarski et al., 2007; Crough y Khanna, 2009) (Figura 2).



**Figura 2. Organización lineal del genoma del citomegalovirus.**

Tomado de: Crough y Khanna, 2009

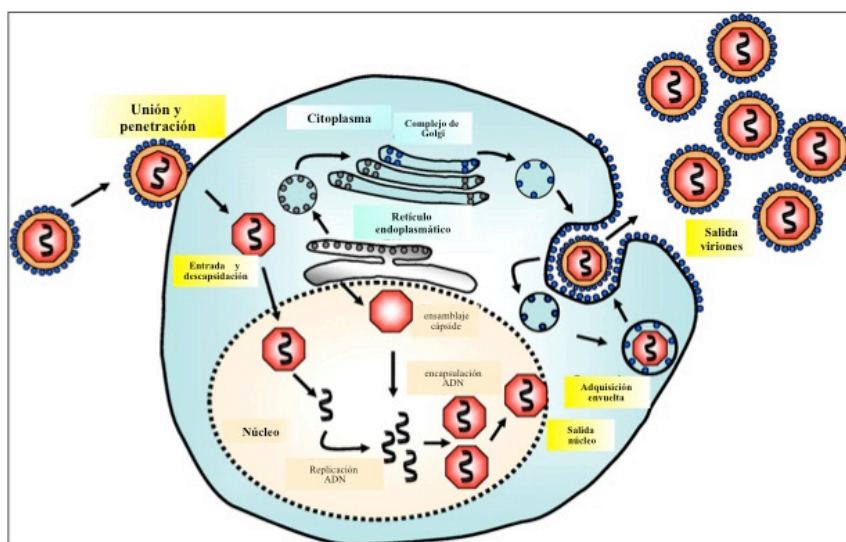
El CMV presenta un elevado polimorfismo, existiendo múltiples cepas diferentes, que varían tanto en el tamaño del genoma, como en el número de repeticiones terminales del genoma (Mocarski et al., 2007), aunque no se han encontrado diferencias en su capacidad de producir enfermedad.

#### **2.4.2. Ciclo replicativo y latencia**

El CMV infecta a un amplio espectro de células humanas, estableciendo modelos infectivos diferentes en función de la naturaleza de éstas. Desarrolla un ciclo completo (lítico o productivo) en células epiteliales de glándulas salivales, células endoteliales, o en fibroblastos, donde se producen nuevos viriones. Sin embargo, establece un modelo abortivo o latente, con mínima expresión del genoma, en monocitos, macrófagos o linfocitos T (Sinzger et al., 2008).

El ciclo replicativo se inicia con la interacción de las glicoproteínas gB y gH con el heparansulfato de la célula huésped (Compton et al., 1993) y mediante la unión a las integrinas  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  (Feire et al., 2004). En consecuencia, se produce la fusión

de la envoltura vírica con la membrana celular del huésped. En el citoplasma celular se produce la descapsidación de la partícula vírica y, posteriormente, el ADN migra en dirección al núcleo celular. La replicación productiva del virus en las células permisivas se asocia con la expresión ordenada y regulada de varios genes víricos, al igual que ocurre con el resto de los herpesvirus (Mocarski et al., 2007) (Figura 3).



**Figura 3. Ciclo de vida del citomegalovirus en la célula humana.**

Adaptado de: Crough y Khanna, 2009

La multiplicación del virus dentro de la célula origina un efecto citopático característico que se manifiesta como grandes inclusiones intranucleares densas, producidas por el acúmulo de cromatina viral, que constriñen a la cromatina nuclear a la periferia. Este efecto citopático da lugar a una células de gran tamaño (hasta 20-70 micras de diámetro) y con una gran inclusión basófila intranuclear que, al estar separada de la membrana nuclear por un halo claro, confiere al núcleo un aspecto en *ojo de búho* (Mocarski et al., 2007).

Al igual que los otros miembros de la familia *Herpesviridae*, tras la primoinfección por CMV, el huésped se convierte en portador de por vida, permaneciendo latente en las células de la sangre periférica (linfocitos, monocitos, células *Natural Killer* (NK) y PMN), tejido linfático y en otros órganos. Tiene la capacidad de reactivarse, en general, coincidiendo con deficiencias transitorias o permanentes de la inmunidad celular (Sissons et al., 2002). En la mayoría de las ocasiones, esta reactivación es subclínica y da lugar a una infección activa asintomática. En raras situaciones, y sin que hayan



podido identificarse los factores desencadenantes, se produce una verdadera enfermedad por CMV, con grave riesgo para el paciente. También puede producirse la reinfección en el sujeto seropositivo que es re infectado por una cepa distinta de la que previamente le infectó (exógena), hecho demostrado en trasplantados y en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Mocarski et al., 2007; Crough y Khanna, 2009).

#### **2.4.3. Respuesta inmune frente al virus**

El CMV ha evolucionado en los humanos hasta establecer una relación de mutua coexistencia virus-huésped (infección asintomática / infección latente). Esta asociación se mantiene gracias al sistema inmune del huésped, ya que ciertas situaciones de inmunodepresión pueden dar lugar a una enfermedad severa, incluso letal, como ocurre en fetos y pretérminos inmunológicamente inmaduros, o en receptores de trasplante (Crough y Khanna, 2009).

La respuesta inmune innata tiene un papel fundamental en la fase inicial de la infección contra el CMV. Se pone en marcha tras el reconocimiento y posterior activación de los receptores *Toll-Like* tipo 2 (TLR 2), que interaccionan con las glicoproteínas gB y gH del virus, lo cual da lugar a la estimulación de células dendríticas y macrófagos a liberar citoquinas proinflamatorias e inmunoferón (IFN)  $\alpha/\beta$ , capaces, a su vez, de activar y reclutar PMN y células NK al lugar de la infección (Loewendorf y Benedict, 2010; Jost y Altfeld, 2013). Estas últimas parecen ser determinantes en evitar la progresión inicial de la infección (Jost y Altfeld, 2013).

Sin embargo, la inmunidad específica, mediada por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, representa un papel clave para la resolución de la infección primaria y proporciona una vigilancia inmune viral a largo plazo (Loewendorf y Benedict, 2010). En la infección primaria natural, el CMV presenta un gran número de antígenos diana potenciales, que son degradados en la célula, a través de la vía endógena o proteosomal, en pequeños plásmidos (epítomos). Éstos se unen a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *Major Histocompatibility Complex*), que los presenta para generar la respuesta inmunitaria celular: los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, a través del MHC-I, y los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, mediante el MHC-II (Contreras et al., 2014).

Los epítomos derivados de la proteína matriz pp65 son los responsables, probablemente, del 70-90% de la respuesta de los linfocitos T CD8+. Otros antígenos diana de la respuesta de los linfocitos T CD8+ son las fosfoproteínas pp150, pp50 y las glicoproteínas gB y gH (Moss et al., 2004). Aunque la respuesta de los linfocitos T CD8+ parece ser crítica en el reconocimiento de las células infectadas por el CMV, cada vez son mayores los datos acerca de la importancia de la respuesta T CD4+ en el control de la infección. Probablemente la proteína pp65 y la glicoproteína gB son los antígenos inmunodominantes de la respuesta por los linfocitos T CD4+ (Gamadia et al., 2004).

La participación del mecanismo de defensa humoral es evidente tanto en la primoinfección como en la reactivación, y son tanto de clase IgM como IgG. Los primeros son detectables durante 3 o 4 meses, mientras que los segundos están presentes de por vida. Las proteínas del CMV reconocidas por el sistema inmune humoral son las glicoproteínas gB y gH. El 50% de los anticuerpos neutralizantes está representado por el anticuerpo anti gB (Loomis et al., 2013).

Además, el CMV puede alterar y evadir la respuesta inmune del hospedador interfiriendo en la presentación y procesamiento antigénico mediados por las moléculas del MHC I y II, inhibiendo la respuesta de las células NK; mediante la producción de citoquinas, el bloqueo de las vías apoptóticas y la variabilidad genética (Davis-Poynter y Farrell, 1996; Soderberg-Naucler, 2006; Stack et al., 2012).

#### **2.4.4. Manifestaciones clínicas**

La primoinfección por CMV suele ser asintomática en un individuo inmunocompetente. El cuadro clínico más habitual es un síndrome mononucleósido, difícil de distinguir del que produce el VEB (de Ory Manchón, 1994; Mocarski et al., 2007).

En el cuadro de una infección sistémica, el CMV puede afectar a casi cualquier órgano, aunque se observa sobre todo en pulmón, hígado, cerebro, glándulas salivales, páncreas, riñón, médula ósea y tracto gastrointestinal. Las complicaciones por CMV se manifiestan en el individuo inmunodeprimido, principalmente en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) o sometidos a trasplantes de órganos

sólidos o médula ósea, en los que la infección puede provocar neumonitis, retinitis, encefalitis, etc., y, en ocasiones, producir la muerte (Mocarski et al., 2007; Crough y Kanna, 2009). Además, el CMV es una causa importante de infecciones neonatales o congénitas, ya que es capaz de atravesar la placenta e infectar al feto. Las infecciones congénitas por CMV pueden dar lugar a complicaciones severas como retardo mental, microcefalia, sordera o retinitis (Gunkel et al., 2014; Brecht et al., 2015) (Tabla 3).

**Tabla 3. Manifestaciones clínicas de la infección por CMV**

<b>Sujeto inmunocompetente</b>	Usualmente asintomático, Poco frecuente mononucleosis (fiebre, mialgia, adenopatías, esplenomegalia)
<b>Sujeto inmunocomprometido con trasplante de órgano sólido</b>	Enfermedad febril, con leucopenia Pneumonitis Esofagitis, gastritis, enterocolitis, hepatitis Retinitis Pancreatitis Miocarditis
<b>Sujeto inmunocomprometido con trasplante de médula ósea</b>	Pneumonitis Esofagitis, gastritis, enterocolitis Menos frecuente: retinitis, encefalitis, hepatitis
<b>Sujeto inmunocomprometido con VIH/SIDA</b>	Retinitis Esofagitis, gastritis, enterocolitis Neuropatía periférica, encefalitis Pneumonitis Hepatitis
<b>Feto e infección congénita del recién nacido</b>	Ictericia, hepatoesplenomegalia Microcefalia Sordera Hipotonía, letargia

Modificado de: Mocarski et al., 2007; Crough y Khanna, 2009

#### 2.4.5. Epidemiología

La infección por CMV es de distribución mundial y afecta a la mayoría de la población a lo largo de su vida. Aunque no se conoce completamente la forma de transmisión del CMV, parece realizarse por vía hemática y a través de contacto con personas que excretan el virus en orina, saliva, semen, leche materna, lágrimas y otras secreciones (de Ory Manchón et al., 2001). También se ha confirmado la transmisión a través de fómites, en concreto entre niños a través de juguetes y superficies contaminadas, en los que el virus puede estar presente en forma infecciosa hasta 30 minutos (Hutto et al.,

1986). En los pacientes trasplantados se puede adquirir la infección a través de la sangre o del órgano trasplantado (Singhn, 2006). Se ha reportado un nivel de seroprevalencia mayor para CMV y diversos antecedentes que reflejan riesgo de transmisión sanguínea, como son cirugía, consulta al odontólogo, acupuntura y tatuajes (de Ory Manchón et al., 2001).

Los estudios serológicos indican que la infección (primoinfección) se adquiere durante el periodo fetal, perinatal, durante la infancia o al principio de la edad adulta, en general coincidiendo con la época en que se inician las relaciones sexuales. Aproximadamente, entre el 50 y el 80% de las personas mayores de 35 años han estado expuestas al virus y esta cifra se acerca al 100% en países subdesarrollados y grupos socioeconómicos desfavorecidos (Cannon et al., 2010).

## **2.5. Virus Epstein-Barr**

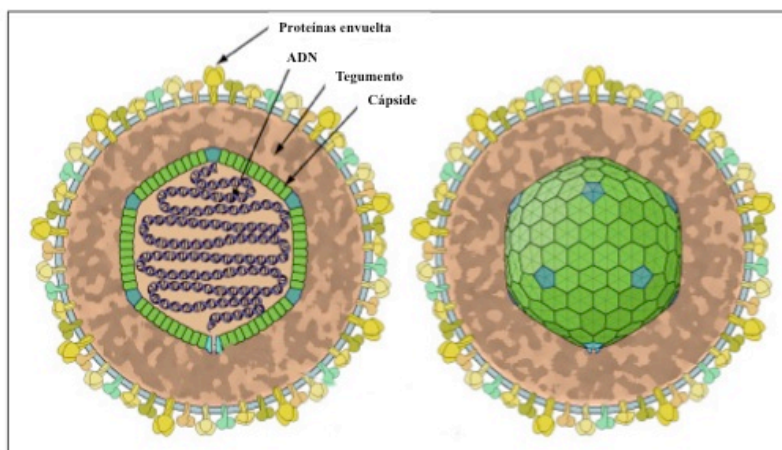
El VEB es un virus ubicuo y linfotropo perteneciente a la subfamilia *Gammaherpesvirinae*, que comparte con otros herpesvirus la capacidad de establecer infecciones latentes. La infección por VEB es generalmente benigna y autolimitada en el individuo inmunocompetente, sin embargo es potencialmente grave en el enfermo inmunodeprimido. A diferencia de otros herpesvirus, el VEB es un virus oncogénico, implicado en la etiopatogenia de diversas neoplasias de linfocitos B (linfoma de Burkitt, ciertos linfomas de Hodgkin y linfomas inmunoblásticos en inmunodeprimidos), de células epiteliales (carcinoma nasofaríngeo y linfopiteliomas) y de células de músculo liso (leiomiomas en inmunodeprimidos) (Rickinson y Kieff, 2007).

Estudios seroepidemiológicos han mostrado que el VEB está ampliamente distribuido en la población humana, con más del 90% de la población adulta mundial seropositiva, y el 70% de la misma lo es antes de los 30 años, persistiendo en el hospedador durante toda su vida (Rickinson y Kieff, 2007).

### **2.5.1. Estructura**

El VEB, como todos los herpesvirus, es un virus encapsulado de gran tamaño. Presenta una envuelta lipoproteica, con glicoproteínas en su interior, que se proyectan hacia el exterior (Figura 4). La glicoproteína más abundante de la envuelta, la gp350/220, es

específica de éste. El resto de glicoproteínas de la cubierta, como gp85, gp110, gp84/113 y gp15, sin embargo, sí son homólogas a otros herpesvirus, como gH, gL, gB, gM y gN, respectivamente (Kieff y Rickinson, 2007). Seguidamente, hay una zona de proteínas con apariencia fibrosa denominada tegumento. Por último, envolviendo al ADN, se encuentra la cápside, de estructura icosaédrica, constituida por 162 capsómeros (Kieff y Rickinson, 2007).

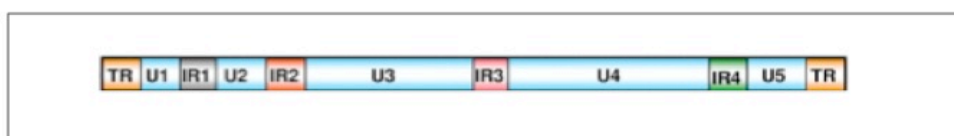


**Figura 4. Estructura del virus Epstein-barr.**

Tomado de: [http://www.expasy.ch/viralzone/all\\_by\\_species/185.html](http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/185.html)

El genoma del VEB, de 184 kpb, codifica, aproximadamente, unas 100 proteínas. Está compuesto, en un 60% por guanina y citosina (Baer et al., 1984) y está organizado en dos secuencias únicas y no repetidas, una secuencia larga ( $U_L$ ) y otra corta ( $U_S$ ), flanqueadas por repeticiones terminales (TR) que permiten la organización del genoma.

Las regiones  $U_L$  y  $U_S$  poseen la mayor parte de la capacidad codificante. Incluyen repeticiones de ADN en tándem, la mayoría de las cuales están dentro de marcos de lecturas abiertos (ORFs). Se pueden observar de seis a doce zonas de repetición interna (IR) de 3 kpb (Cheung y Kieff, 1982), flanqueadas cada una de ellas por una región TR (Figura 5).



**Figura 5. Organización lineal del genoma del virus Epstein-Barr.**

Tomado de: Crough y Khanna, 2009

Se han descrito dos subtipos del virus, el VEB-1 y el VEB-2, los cuales muestran gran homología a lo largo de la mayor parte del genoma, pero presentan polimorfismos en algunos de sus genes (Puchhammer-Stöckl y Görzer, 2006).

### 2.5.2. Ciclo replicativo y latencia

El VEB es capaz de infectar un espectro limitado de células en las que puede establecer un modelo infectivo lítico, que culmina con la producción de nuevas partículas víricas (típico en células epiteliales), o latente (característico en linfocitos B), en el que existe una mínima expresión de genes y que no tiene como consecuencia la producción de nuevos viriones (Murata, 2014). Al mismo tiempo, el VEB puede producir infecciones transformantes, tanto en células epiteliales como en linfocitos B, en las que existe un patrón variable de expresión de genes víricos (Kieff y Rickinson, 2007).

El ciclo biológico completo (infección lítica) del VEB se inicia por la interacción de la glicoproteína vírica de membrana gp350/220 con un receptor celular presente en la membrana de las células susceptibles (linfocitos B, así como en algunas células epiteliales de la orofaringe y nasofaringe), la molécula CD21 (también denominada CR2), que es a su vez el receptor para C3d (fragmento d del factor C3 del complemento) (Nemerow et al., 1990; Moore et al., 1991). El VEB también emplea moléculas del MHC-II como correceptoras. Otra glicoproteína, gp85, es especialmente importante para la fusión de la envoltura con las membranas celulares (Urquiza et al., 2004).

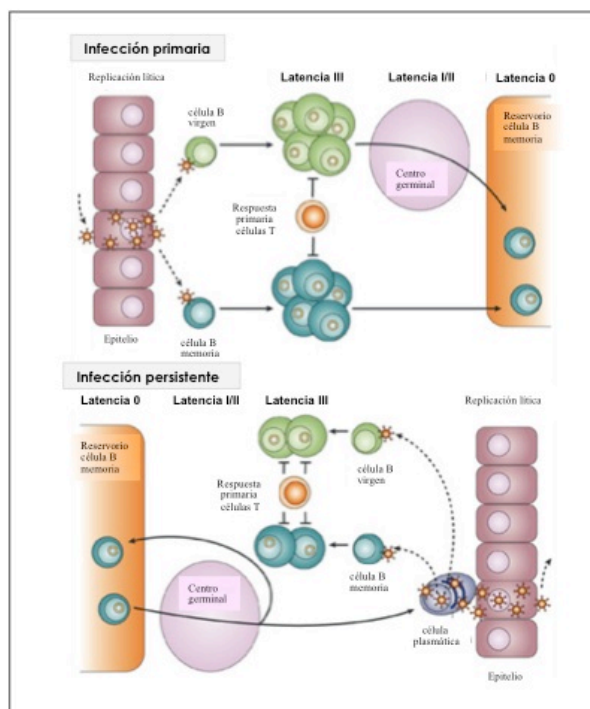
Las primeras proteínas que se expresan tras la infección pertenecen al complejo EBNA (*Epstein-Barr Virus-associated Nuclear Antigens*), que son un total de seis (1, 2, 3A, 3B, 3C, LP). EBNA-1 es necesaria para el mantenimiento del genoma del VEB en forma episómica, hecho que parece esencial para la transmisión del genoma de VEB de células parentales a la progenie y para el mantenimiento del estado de latencia. EBNA-2 es necesaria para la immortalización de linfocitos B y, al mismo tiempo, es un potente transactivador de otros genes víricos y celulares. A continuación, se sintetizan varias proteínas precoces de membrana, denominadas LMP (*latent membrane protein*), como LMP1, 2A y 2B. LMP-1 es particularmente importante, ya que actúa como un potente transactivador de diversos genes víricos y celulares implicados en la transformación de linfocitos B inducida por el VEB. Seguidamente, se sintetizan varias proteínas precoces

con actividad enzimática (ADN polimerasa, timidina kinasa). Posteriormente, se produce la síntesis de varias copias de ADN vírico, que se encuentran en la célula en forma de episomas, y más tarde la síntesis de proteínas estructurales de la cápside (complejo antigénico VCA, *viral capsid antigens*) y de membrana (LMA, *late membrane antigens*). Este modelo infectivo productivo finaliza con la liberación de nuevos viriones y la lisis de la célula infectada (Alfieri et al., 1991; Villegas et al., 2010; Hatton et al., 2014; Murata, 2014).

Tras la infección primaria, en la mayoría de las células B infectadas, el VEB permanece en fase latente y tiene capacidad de inducir la immortalización de la célula. Sin embargo, el genoma no se integra en el núcleo de la célula, manteniéndose como episoma circular y se detiene la replicación vírica (Alfieri et al., 1991), aunque no completamente, ya que durante la latencia se transcriben, al menos, nueve ARNm poliadenados y dos pequeños ARN no poliadenados (EBER1 y EBER2) (Thorley-Lawson, 2001).

Una vez la célula B es infectada por el VEB, se han descrito varios patrones de expresión de proteínas virales, denominadas fases de latencia (Thorley-Lawson, 2001; Saha y Robertson, 2001; Young y Rickinson, 2004; Villegas et al., 2010; Thorley-Lawson et al., 2013) (Figura 6):

- **Latencia tipo 0:** permite la persistencia del virus en células B memoria circulantes inactivas, sin ser detectadas por el sistema inmune.
- **Latencia tipo I:** se observa en biopsias celulares y líneas celulares de linfoma de Burkitt y en linfocitos circulantes infectados de individuos sanos. La función propuesta es permitir a la célula B memoria dividir el ADN.
- **Latencia tipo II:** se observa en el carcinoma nasofaríngeo, aunque también se ha reproducido en híbridos de fibroblastos, en líneas epiteliales que expresan el receptor CD21 y en el linfoma Hodgkin. La función propuesta es la activación de las células B inactivas para producir un linfoblasto proliferante.
- **Latencia tipo III:** se observa en líneas celulares linfoblastoides, en los procesos linfoproliferativos postrasplante y líneas de linfoma de Burkitt. La función propuesta para esta fase es proporcionar las señales necesarias para la diferenciación de linfoblastos infectados hacia células memoria, y el mantenimiento y persistencia de éstas.



**Figura 6. Infección primaria e infección persistente del virus Epstein-Barr.**

Tomado de: Young y Rickinson, 2004

### 2.5.3. Respuesta inmune frente al virus

La respuesta inmunitaria frente a los linfocitos transformados por la infección del VEB es compleja, e involucra tanto a mecanismos de la inmunidad humoral como de la celular. Para evitar la proliferación incontrolada de estas células, se requiere una adecuada respuesta inmune, aunque dicha respuesta sea responsable también de la mayoría de los síntomas de la mononucleosis infecciosa (Kieff y Rickinson, 2007).

La respuesta citotóxica de las células T se encarga de destruir las células infectadas que expresan proteínas virales. En la mononucleosis infecciosa, más del 50% de todas las células T CD8<sup>+</sup> presentan una respuesta directa frente a las células en las que el virus se está replicando, principalmente células memoria (Thorley-Lawson y Gross, 2004; Villegas et al., 2010). Por el contrario, las células CD4<sup>+</sup> no presentan una respuesta masiva como las células T CD8<sup>+</sup> (White et al., 1996).

El componente NK podría ser la primera defensa en la respuesta inmune innata frente a infección viral (Tomkinson et al., 1989), aunque parece que tiene un valor limitado en el control de la infección latente, como se ha visto en pacientes trasplantados de médula ósea (Babcock et al., 1999).



Las respuestas inmunes humoral y celular, al final de la enfermedad aguda, son incapaces de eliminar el virus completamente y, como consecuencia, éste persiste en las células infectadas. Durante la fase de persistencia, se detecta la presencia de linfocitos T memoria CD8+ específicos frente a antígenos latentes (Khanna et al., 1992).

Además, el VEB puede alterar y evadir la respuesta inmune del hospedador mediante la evasión de la presentación de antígenos, la apoptosis, la producción de citoquinas y la variabilidad genética (Ohga et al., 2002; Stack et al., 2012).

#### 2.5.4. Manifestaciones clínicas

El VEB está asociado fundamentalmente a dos tipos de patologías: mononucleosis infecciosa y enfermedades neoplásicas, como el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo (Kutok y Wang, 2006; Rezk y Weiss, 2007; Villegas et al., 2010). Los procesos clínicos aparecen reflejados en la Tabla 4.

**Tabla 4. Enfermedades asociadas al VEB**

<b>Enfermedades no malignas</b>	Mononucleosis infecciosa
	Infección activa crónica
	Leucoplasia vellosa oral
<b>Enfermedades malignas de células B en sujetos inmunocomprometidos</b>	Linfoma de células B asociado a SIDA
	Enfermedad linfoproliferativa post-trasplante
	Granulomatosis linfomatoide
	Linfoma de células B asociado a inmunodeficiencia severa combinada
	Linfoma de células B asociado al síndrome de Wiskott-Aldrich
	Linfoma de células B asociado a desorden linfoproliferativo ligado al cromosoma X
<b>Enfermedades malignas de células B en sujetos inmunocompetentes</b>	Linfoma de Burkitt
	Linfoma de Hodgkin
<b>Enfermedades malignas de células T</b>	Linfoma de linfocitos NK/T extranodal de tipo nasal
	Linfoma de linfocitos T con síndrome hemafagocítico asociado al VEB
	Linfoma de linfocitos T angio-immunoblástico
	Linfoma de linfocitos T hepatoesplénico
	Linfoma de linfocitos T no hepatoesplénico
<b>Enfermedades malignas de células epiteliales</b>	Linfoma de linfocitos T enteropático
	Carcinoma nasofaríngeo no glandular
<b>Otras enfermedades malignas</b>	Carcinoma hepatocelular
	Carcinoma de células dendríticas foliculares

Modificado de: Kutok y Wang, 2006; Rezk y Weiss, 2007

### **2.5.5. Epidemiología**

Más del 90% de los adultos de todo el mundo están infectados por el VEB y son portadores durante toda su vida. En los países desarrollados la infección primaria ocurre, frecuentemente, en dos periodos de la vida: durante la infancia y en la adolescencia o principio de la edad adulta (Pariente et al., 2007). Durante la infancia, la infección es debida a la transmisión a través de la saliva entre los miembros de la familia o contactos cercanos y, habitualmente, su presentación es subclínica. Sin embargo, en adolescentes y adultos, es más frecuente la aparición de síntomas propios de mononucleosis infecciosa.

Aunque su distribución es universal, la seroprevalencia es mayor en los trópicos (Higgings et al., 2007). Los dos tipos virales son detectados en todas las latitudes, pero el VEB-1 es más frecuente en África Central, Norteamérica, Europa, Papúa-Nueva Guinea y Asia. El VEB-2 es más frecuente en África Central (Macswen y Crawford, 2003; Kieff y Rickinson, 2007). Cuando los estudios poblacionales se combinan entre sí, los resultados muestran que el 74% de la población caucásica está infectada por el VEB-1, el 19% con el VEB-2 y el 7% está coinfectado por ambos tipos virales (Chang et al., 2009).

Se ha observado una mayor seroprevalencia en mujeres que en hombres (Higgings et al., 2007). Aunque se piensa que la actividad sexual puede ser un factor de riesgo, no queda claro si la transmisión en este caso es a través de fluidos genitales o de la saliva.

La presencia del virus latente en células B de sangre periférica en individuos sanos, arroja otra potencial ruta de transmisión. Así, se han documentado infecciones post-transfusionales y post-trasplante (Gratama et al., 1992; Macswen y Crawford, 2003). También se transmite a través de fómites, compartiendo objetos como cepillos de dientes y vasos (Gratama et al., 1990).

### **2.6. Métodos de detección del CMV y VEB**

Existen dos aproximaciones para el diagnóstico específico de las infecciones por los herpesvirus. Por una parte, el aislamiento y/o identificación del virus o alguno de sus componentes o productos y, por otra, la puesta en evidencia de una respuesta serológica

específica. La aplicación de un método u otro depende de varios factores, incluyendo las características de crecimiento de los virus *in vitro*, y por tanto, la facilidad para el aislamiento, la respuesta inmune que induce la infección, y el desarrollo de tecnologías adecuadas para cada una de las aproximaciones (de Ory Manchón, 1994).

Debe tenerse en cuenta que la eliminación de estos virus asintomática es posible y, por tanto, el aislamiento del virus a partir de las lesiones no siempre tiene significación clínica.

### **2.6.1. Métodos indirectos**

Las técnicas inmunológicas o serológicas identifican anticuerpos específicos, anti-CMV o anti-VEB, mediante el empleo de diferentes técnicas, como la fijación del complemento, neutralización, inhibición de la hemaglutinación, radioinmunoanálisis, inmunofluorescencia indirecta (IFI), enzoinmunoensayo (ELISA), aglutinación pasiva con partículas de látex, etc. (Kieff y Rickinson, 2007; Mocarski et al., 2007).

Cuando se produce una infección, coincidiendo con la aparición de los síntomas, se comienza a detectar una respuesta serológica específica. En general, se puede establecer que la presencia de IgM es más rápida en su aparición así como en su duración que la respuesta IgG, siendo ésta perdurable probablemente durante toda la vida del individuo. Ambos isotipos son los que tienen mayor significado desde el punto de vista serológico. Así, se pueden diagnosticar serológicamente infecciones por CMV o VEB, bien detectando IgM específica, o poniendo en evidencia una seroconversión o aumento significativo del título de IgG o de anticuerpos totales. Como es obvio, esta última alternativa es menos práctica, puesto que requiere el estudio de muestras separadas entre 7 y 15 días, no pudiéndose obtener un resultado de forma rápida (de Ory Manchón, 1994; Pellet y Roizman, 2007; de Paschale y Clerici, 2012).

### **2.6.2. Métodos directos**

El cultivo celular fue durante años considerado la técnica de referencia para el diagnóstico de estos herpesvirus, especialmente para el CMV. En cultivo ordinario, el CMV es de lento crecimiento, tardando varios días o algunas semanas, por lo que en la mayoría de los laboratorios se ha sustituido por una variante conocida como cultivo-

centrifugación o *shell vial*. Esta última técnica ofrece resultados en uno o dos días, con una sensibilidad y especificidad equivalentes al cultivo tradicional (Mocarski et al., 2007; Botero et al., 2008c).

El aislamiento del VEB está muy condicionado por su propia biología. Aunque se han reconocido varios tipos celulares naturalmente susceptibles de infección por el virus, como los linfocitos B o las células epiteliales, *in vitro* se reduce el espectro a los linfocitos B, que son transformados por el virus. El proceso tiene dos inconvenientes, que son la lentitud y la complicación tecnológica, que hacen que no sea un método diagnóstico disponible de forma rutinaria en la mayor parte de los laboratorios de virología (de Ory Manchón, 1994; Kieff y Rickinson, 2007).

Se han empleado otros métodos directos, como la detección de antígenos virales mediante anticuerpos monoclonales comercializados o inmunofluorescencia directa (IFD), la identificación de proteínas virales mediante *Western Blot* y técnicas moleculares, como la hibridación con sondas específicas, el *Southern Blot* y la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (o PCR, *Polymerase Chain Reaction*). Actualmente, esta última es la más empleada en la mayor parte de los laboratorios de microbiología, por su rapidez, alta sensibilidad y especificidad (Kieff y Rickinson, 2007; Mocarski et al., 2007).

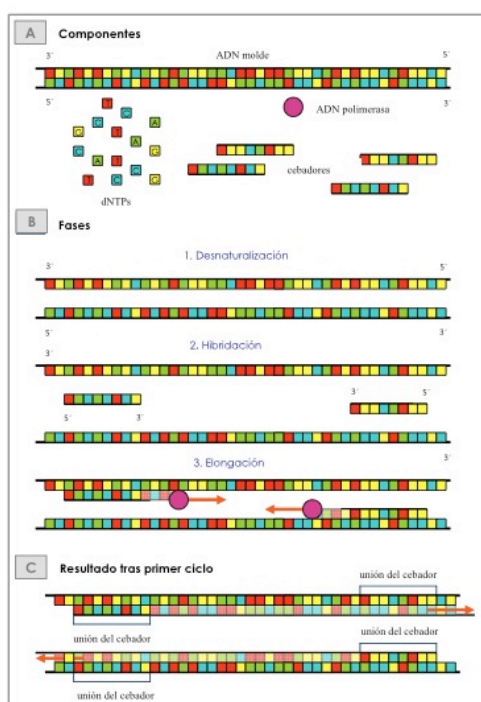
### ***Reacción en cadena de la polimerasa o PCR***

Es un método químico que surgió hace 30 años, con la necesidad de obtener grandes cantidades de ácido nucleico para un análisis detallado (Saiki et al., 1988; Schochetman et al., 1988; Gibbs, 1990; Tarasevich et al., 2003). Esta técnica se basa en la detección de una secuencia específica de ADN mediante la obtención de copias de la misma por medios enzimáticos. Tiene como finalidad amplificar hasta un millón de veces una secuencia determinada de ADN, de la cual se conoce un fragmento corto de secuencia de cada uno de sus extremos (Saiki et al., 1988).

Los elementos necesarios para una reacción de PCR son: ADN sustrato, cebadores, también denominados iniciadores o *primers*, que son oligonucleótidos con una secuencia conocida, que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. También se requiere de una ADN polimerasa,

desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), solución tampón, con alguna fuente de ión  $Mg^{2+}$ . En 1988, se optimizó la técnica con la introducción de la *Taq* polimerasa, aislada de una bacteria termófila (*Thermus aquaticus*), la cual resistía altas temperaturas y mostraba un mayor rendimiento al colocar la enzima al principio de la reacción (Saiki et al., 1988; Neumaier et al., 1998). El esquema en ciclos y las propiedades de la *Taq* polimerasa han permitido la automatización de la reacción por medio de aparatos denominados termocicladores (Saiki et al., 1988; Neumaier et al., 1998).

La amplificación se realiza varias veces o ciclos. Cada ciclo conlleva la desnaturalización de cadenas complementarias, la hibridación de los *primers* con las cadenas originales y la extensión o elongación del *primer* mediante la polimerasa (Figura 7). Estos tres pasos se repiten “n” veces, duplicándose en cada ciclo el número de cadenas, siendo por tanto, una amplificación exponencial o logarítmica, en la que las cadenas previamente sintetizadas pueden servir de molde a futuras amplificaciones. La temperatura de cada paso del ciclo es muy importante, ya que nos permite regular la desnaturalización de la doble cadena original y la estabilidad del híbrido constituido por el filamento modelo y el *primer*. Cuanto menor sea la temperatura de hibridación, menor será la especificidad de la PCR, ya que el primer podría unirse a secuencias que no son totalmente complementarias a él.



**Figura 7. Representación esquemática de una PCR.**

Modificado de: <http://hdl.handle.net/10251/10700>

La PCR puede llegar a detectar una sola copia del fragmento buscado (Saiki et al., 1988). La alta sensibilidad de este método hace que deba utilizarse bajo condiciones extremas de asepsia y ausencia de contaminación, especialmente por ácidos nucleicos, ante la posibilidad de amplificación de ADN extraños. Por ello, la transferencia de líquidos y el material de laboratorio debe ser destinada específicamente para PCR, y colocado en cabina de luz ultravioleta (Gibbs, 1990).

Una vez culminada la reacción y obtenido el producto amplificado, es necesario detectarlo. Lo más frecuente es realizar la electroforesis en gel de agarosa y bromuro de etidio para la visualización de las bandas que representan la secuencia amplificada. Generalmente, los resultados son cualitativos (Saiki et al., 1988; Neumaier et al., 1998).

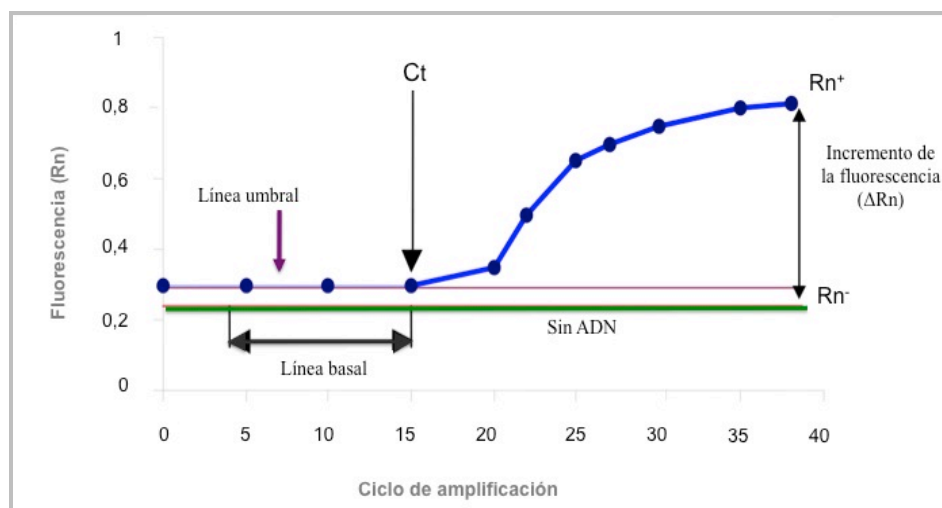
Por tanto, la técnica de PCR ofrece importante ventajas: rapidez, simplicidad, elevada efectividad y, sobre todo, alta sensibilidad y especificidad, lo cual la convierte en uno de los mejores métodos para la detección de virus herpes en prácticamente cualquier tipo de muestra clínica. De hecho, hasta el momento ha permitido la detección de virus herpes en muestras tales como saliva, fluido crevicular gingival (FCG), placa subgingival, tejido gingival, orina, sangre periférica, líquido cefalorraquídeo, etc. (Imbronito et al., 2008a; Rotola et al., 2008; Soetens et al., 2008; Dawson et al., 2009b). Uno de los principales inconvenientes es que es cualitativa en su formato convencional, por lo que solo se puede detectar aquello que se busca.

En los últimos años se han desarrollado variantes de esta técnica, que pueden no ser mutuamente excluyentes. Algunas de ellas son:

- **PCR de transcripción inversa o RT-PCR** (*Reverse transcriptase PCR*): permite el estudio de ARN mediante PCR. Utiliza la enzima transcriptasa inversa para producir su ADN complementario monocatenario (ADNc), y éste ya puede ser amplificado de forma ordinaria. Actualmente, existe otra polimerasa, llamada Tth, derivada de la bacteria *Thermus thermophilus*, que presenta actividad de retrotranscriptasa y de ADN-polimerasa, en función del cofactor que se emplee (magnesio o manganeso), y se suele emplear para determinar la carga viral de VIH (Mulder et al., 1994; Yamamoto et al., 2002).

- **PCR anidada o doble** (*nested PCR*): se realizan dos rondas de amplificaciones. La primera, sería como una PCR convencional. En la segunda, se emplean una segunda pareja de iniciadores que amplificarían una parte del fragmento anteriormente amplificado, de ahí que a estos iniciadores se les denomina internos. El resto de componentes de la mezcla de reacción sería idéntico al anteriormente expuesto. Esta técnica es particularmente eficaz para detectar pequeñas cargas virales (Rotola et al., 2008; Botero et al., 2008c).
- **PCR múltiple** (*Multiplex PCR*): permite amplificar varias regiones diana añadiendo todos los *primers* necesarios en una sola reacción. De esta forma, es posible detectar varios virus al mismo tiempo (Santagelo et al., 2004; Tanaka et al., 2009; Das et al., 2012).
- **PCR con *primers* arbitrarios o AP-PCR** (*Arbitrally Primed PCR*): emplea segmentos arbitrarios de ADN en lugar de secuencias definidas. Se ha utilizado para identificar bacterias dentro de una misma especie (Mätto et al., 1996).
- **PCR cuantitativa**: permite la cuantificación de todos los fragmentos de ADN empleando controles específicos, que se encuentran en cantidades conocidas. Sin embargo, esta técnica presentaba problemas en la metodología ya que normalmente había una débil correlación entre el producto final de la PCR y la cantidad inicial de ADN (Verdugo et al., 2012; Verdugo et al., 2015).
- **PCR cuantitativa en tiempo real** (*Quantitative real-time PCR*): es básicamente, una PCR estándar en la que los termocicladores llevan incorporados un sistema de detección de fluorescencia o fluorímetro. Esto permite la visualización en directo de la amplificación del ADN por la adquisición de la señal de fluorescencia que se produce en cada reacción de amplificación en cada uno de los ciclos. Por tanto, esta técnica combina los pasos de amplificación de ADN y de la detección en un único ensayo, sustituyendo a la electroforesis y análisis de imagen de una PCR estándar. El fundamento teórico se basa en que la cantidad inicial de ADN en una muestra es proporcional a la fluorescencia emitida en el ciclo en el que comienza el crecimiento exponencial de la reacción, denominado ciclo umbral o Ct (*threshold cycle*). Por tanto, cuanto más alto es el número de copias de los ácidos nucleicos a amplificar, antes se observa un aumento significativo en la fluorescencia, y son más bajos los valores de Ct.

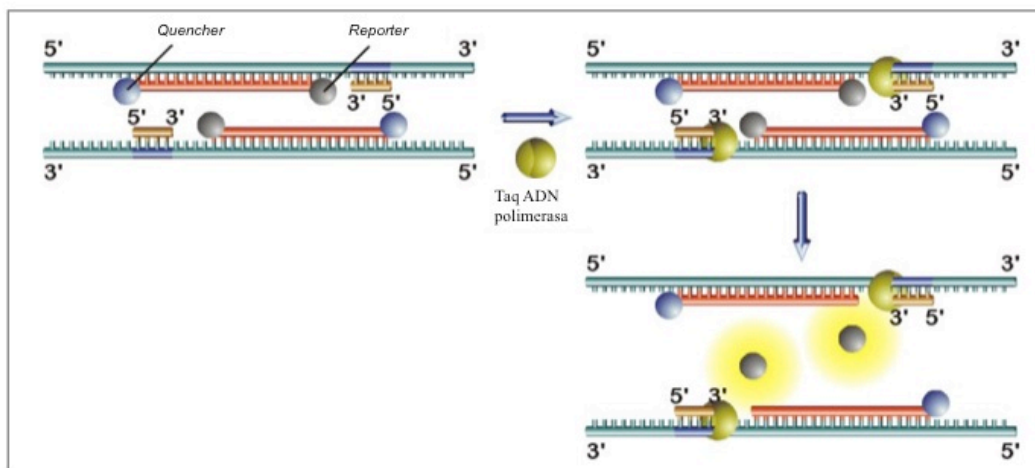
Los termocicladores tienen incorporados un ordenador con un *software*, que genera una serie de gráficas en donde se muestran los datos necesarios de la reacción (Crockett y Wittwer, 2001; Espy et al., 2006) (Figura 8).



**Figura 8.** Gráfico de amplificación donde se muestran los términos comúnmente empleados en la PCR en tiempo real.

Las sondas más empleadas en la cuantificación de la carga viral son las sondas de hidrólisis o TaqMan. Dicho sistema se basa en la utilización de una sonda marcada con una molécula fluorescente (denominada también donador o *reporter*) en su extremo 5' (generalmente FAM) y un amortiguador de fluorescencia en 3' (aceptor o *quencher*) (tradicionalmente TAMRA). Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor, debido a su proximidad. Sin embargo, cuando la ADN polimerasa comienza el proceso de amplificación y se encuentra con la sonda, gracias a su actividad exonucleasa 5'→3, libera el donador al medio separándolo del aceptor, lo que ocasiona un aumento irreversible de la fluorescencia detectada (Figura 9). Este proceso se repite en cada ciclo y no interfiere con la acumulación exponencial del producto de PCR. Este método presenta una especificidad muy alta (Heid et al., 1996; Espy et al., 2006).





**Figura 9. PCR en tiempo real mediante sonda TaqMan.**

Tomado de: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/pdf%20solu/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf>

La gran ventaja de la PCR en tiempo real es que no necesita análisis post-PCR, como sucede en la PCR estándar. Al realizarse en un sistema cerrado y no tener que manipular los amplificadores, se disminuyen los riesgos de contaminación, previniendo los falsos positivos (Kaltenboech y Wagn, 2005). Otra gran ventaja es su rapidez, obteniendo resultados en poco tiempo (30-40 minutos). Gracias a su rapidez y a su capacidad, los equipos de PCR se pueden rentabilizar al máximo, permitiendo un flujo mayor de muestras y ensayos. Además, estos sistemas permiten cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en las muestras de manera mucho más sencilla, precisa y, sobre todo, en un rango mucho mayor (5-6 log) que en los procedimientos convencionales (2-4 log) (Espy et al., 2006).

Sin embargo, el tipo de muestra, los métodos de extracción del ADN y los diferentes protocolos empleados en los distintos laboratorios son difícilmente comparables, presentando diferencias significativas en el límite de detección y en el rango de cuantificación. Por ello, la cuantificación del ADN viral y, en concreto del CMV y del VEB, ha de ser tomada con cautela, fuera de la comparación interna del mismo laboratorio (Espy et al., 2006).

### **3. ASOCIACIÓN ENTRE LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES Y LOS HERPESVIRUS (CMV Y VEB)**

Como se ha expuesto, hasta la fecha, las bacterias se consideran el factor etiológico principal para el desarrollo de las enfermedades periodontales, y su interacción con el huésped es la base de la etiopatogenia de estos procesos. Sin embargo, aún existen ciertos aspectos sin resolver acerca de las diferentes características clínicas de su presentación, sobre la tendencia a progresar según un patrón localizado en algunos sujetos, la frecuente destrucción simétrica bilateral o su tendencia a la destrucción en forma de episodios de actividad seguidos de remisión. Probablemente, estas variaciones clínicas son consecuencia de las diferencias en el tipo y cantidad de agentes infecciosos, así como a factores asociados a la respuesta del huésped y, en este sentido, pueden existir elementos aún por determinar que tengan relevancia en la etiología y desarrollo de estas enfermedades.

Desde de la década de los años 90, se ha evaluado la posible implicación que los herpesvirus podrían tener en el inicio y progresión de las enfermedades gingivales y periodontales. Aunque se han estudiado diferentes herpesvirus en lesiones periodontales, como el VHS-1 (Contreras et al, 2000a; Ting et al., 2000; Kamma et al., 2001; Saygun et al., 2002; Ling et al., 2004; Saygun et al., 2005), VHH-6 (Contreras et al., 2000b; Tantivanich et al., 2004), VHH-7 (Cassai et al., 2003; Rotola et al., 2008; Thomasini et al., 2012) y VHH-8 (Cassai et al., 2003), son el CMV y el VEB los que podrían tener un papel especialmente relevante en la etiopatogenia de determinadas formas de las periodontitis.

En este sentido, se han detectado copias del genoma de estos dos virus en muestras de placa subgingival o FCG, biopsias gingivales y saliva, de forma frecuente y en altas proporciones en periodontitis crónica (Contreras et al., 2000a; Ling et al., 2004; Saygun et al., 2002; Imbronito et al., 2008b; Rotola et al., 2008; Bilichodmath et al., 2009; Chalabi et al., 2010; Nibali et al., 2009), periodontitis agresiva (Michalowicz et al., 2000; Kamma et al., 2001; Yapar et al., 2003; Saygun et al., 2004b; Rotola et al., 2008; Nibali et al., 2009), gingivitis (Imbronito et al., 2008b; Grenier et al., 2009), gingivitis ulceronecrotizante (Contreras et al., 1997), abscesos periodontales (Saygun et al., 2004a), periodontitis en pacientes VIH (Contreras et al., 2001; Grande et al., 2008;

Grande et al., 2011), algunas formas raras de periodontitis avanzadas asociadas a enfermedades sistémicas (Velazco et al., 1999; Nowzari et al., 2001; Nowzari et al., 2003; Hanookai et al., 2000) y en periimplantitis (Verdugo et al., 2015).

La asociación más fuerte quizás proviene de estudios en periodontitis agresiva, en los que se observa mayor detección de uno o de ambos virus en localizaciones activas en comparación con las estables (Ting et al., 2000; Kamma et al., 2001; Slots et al., 2002) y de estudios en periodontitis crónica, con mayor presencia en bolsas profundas que en bolsas superficiales (Contreras et al., 1996; Chalabi et al., 2010; Konstantinidis et al., 2005).

### **3.1. Estudios de prevalencia**

Numerosos estudios ecológicos en distintas poblaciones han evaluado la prevalencia del CMV y del VEB, tanto en sujetos con periodontitis y periodontalmente sanos, empleando diferentes técnicas de PCR, observando resultados muy heterogéneos.

En el caso del CMV, la prevalencia oscila entre el 0 y el 76.3% en individuos sanos, del 9.7 al 78.5% en gingivitis, del 0 al 82.5% en periodontitis crónica y del 0 al 78% en periodontitis agresiva (Tabla 5).

Para el VEB (tanto VEB tipo 1 y 2), la frecuencia de detección en individuos sanos se halla entre el 0 y el 45%, en gingivitis entre el 0 y el 32.3%, mientras que en periodontitis crónica y agresiva oscila del 0 al 78.9%, y del 3.1 al 89%, respectivamente (Tabla 6).

**Tabla 5. Prevalencia de CMV en muestras subgingivales mediante PCR**

<b>Autor, año (País)</b>	<b>Población</b>	<b>Método de recogida</b>	<b>Técnica PCR</b>	<b>Prevalencia CMV</b>
Contreras et al., 1996 (EE.UU.)	27 Periodontitis	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen IE LOD: n/d	Localizaciones 7-9 mm: 51.85% Localizaciones 3-5 mm: 18.51%
Parra y Slots, 1996 (EE.UU.)	30 Periodontitis avanzada 26 Gingivitis leve	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen MIE 136 LOD: 5 copias	Periodontitis avanzada: 60% Gingivitis: 31%
Contreras et al., 1999a (EE.UU.)	140 sujetos 30 Periodontitis avanzada 38 Periodontitis moderada 31 Periodontitis leve 41 Gingivitis	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen MIE 136 LOD: 5-75 copias	Periodontitis avanzada: 33% Periodontitis moderada: 24% Periodontitis leve: 29% Gingivitis: 9.7%
Michalowicz et al., 2000 (Jamaica)	15 Periodontitis juvenil 20 Periodontitis inicial 65 Sanos	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen IE LOD: n/d	Periodontitis juvenil: 73% Periodontitis leve: 40% Sanos: 22%
Ting et al., 2000 (EE.UU.)	11 Periodontitis juvenil localizada	Punta de papel	PCR anidada: <i>Primer:</i> gen IE PCR-RT: <i>Primer:</i> gen MPC LOD: n/d	Localizaciones periodontales: 72.7% Localizaciones sanas: 18.2% CMV activo en 54.5% de localizaciones periodontales y no en sanas
Kamma et al., 2001 (Grecia)	16 Periodontitis de aparición temprana en mantenimiento	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen MIE 136 LOD: 10 copias	Localizaciones activas: 59.4% Localizaciones estables: 12.5%
Saygun et al., 2002 (Turquía)	30 Periodontitis crónica 21 Sanos	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen IE LOD: 50-500 genomas/ml	Periodontitis crónica: 43.3% Sanos: 14.3%
Slots et al., 2002 (Grecia)	16 Periodontitis agresiva en mantenimiento	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen IE LOD: n/d	Localizaciones activas: 59.4% Localizaciones estables: 12.5%
Yapar et al., 2003 (Turquía)	17 Periodontitis agresiva 16 sanos 3 meses después de tratamiento mecánico	Cureta	PCR convencional <i>Primer:</i> gen IE LOD: 100 genomas/ml	Periodontitis agresiva: 64.7% Sanos: 0%
Kubar et al., 2004 (Turquía)	16 Periodontitis agresiva 15 Sanos	Cureta	PCR en tiempo real <i>Primer:</i> gen IE LOD: 10-10 <sup>7</sup> copias/ml	Periodontitis agresiva: 68.8% Sanos: 0%
Ling et al., 2004 (Taiwan)	20 Periodontitis 120 localizaciones	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen MIE 136 LOD: n/d	Periodontitis: 75% 51.7% de las localizaciones
Saygun et al., 2004 (Turquía)	18 Periodontitis agresiva 16 sanos	Cureta	PCR cualitativa <i>Primer:</i> n/d LOD: n/d	Periodontitis agresiva: 72.2% Sanos: 0%
Santangelo et al., 2004 (Italia)	22 Periodontitis de comienzo temprano 22 Periodontitis crónica 22 sanos adultos 22 sanos jóvenes	Punta de papel	PCR múltiple <i>Primer:</i> gen MIE CMV LOD: n/d	Periodontitis de comienzo temprano: 27.2% Periodontitis crónica: 9% Sanos adultos: 31.8% Sanos jóvenes: 18.1%
Tantivanich et al., 2004 (Tailandia)	50 Periodontitis 30 Sanos	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> n/d LOD: n/d	Periodontitis: 34% Sanos: 3.3%
Klemenc et al., 2005 (Eslovenia)	66 Periodontitis 30 sanos	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen IE LOD: n/d	Periodontitis: 3% Sanos: 0%

LOD (*limit of detection*): límite de detección; n/d: no disponible.

**Tabla 5. Prevalencia de CMV en muestras subgingivales mediante PCR (continuación)**

<b>Autor, año (País)</b>	<b>Población</b>	<b>Método de recogida</b>	<b>Técnica PCR</b>	<b>Prevalencia CMV</b>
Kubar et al., 2005 (Turquía)	9 Periodontitis agresiva 11 Periodontitis crónica Tras desbridamiento, 2 semanas previas	Cureta	PCR en tiempo real <i>Primer:</i> diseñado autores LOD: $10^7$ - $10^1$ copias/ml	Periodontitis agresiva: 78% Periodontitis crónica: 46% IgG y IgM+: 4.5% EP IgG y IgM+: 15.4% sanos
Saygun et al., 2005 (Turquía)	20 Periodontitis: 9 Periodontitis agresiva 11 Periodontitis crónica 3 meses postratamiento	Cureta	PCR en tiempo real <i>Primer:</i> diseñado autores LOD: $10^7$ - $10^1$ copias/ml	Periodontitis agresiva: 60% Periodontitis crónica: 60%
Botero et al., 2007 (Colombia)	10 Periodontitis agresiva 20 Periodontitis crónica 22 Sanos	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen MIE 136 LOD: n/d	Periodontitis agresiva: 40% Periodontitis crónica: 60% Sanos: 18.1%
Wu et al., 2007 (China)	143 Periodontitis crónica 65 Gingivitis 76 Sanos	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> diseñado autores LOD: 0,01ng	Periodontitis crónica: 79% Gingivitis: 78,5% Sanos: 76,3% Mayor prevalencia genotipo CMV-gBII que CMV-gBI en periodontitis
Botero et al., 2008c (Colombia)	37 Periodontitis crónica 7 Periodontitis agresiva 24 Sanos	Punta de papel	PCR anidada y PCR en tiempo real <i>Primer:</i> gen MIE 136 LOD: 0.71 copias/ $\mu$ l	PCR anidada: Periodontitis: 79.5% Sanos: 25% PCR en tiempo real: Periodontitis: 47.7% Sanos: 4.1%
Chalabi et al., 2008 (Irán)	61 Periodontitis crónica 40 Sanos	Cureta	PCR anidada <i>Primer:</i> n/d LOD: n/d	Periodontitis: localizaciones $\leq$ 3 mm: 0% localizaciones $\geq$ 6 mm: 59.0% Sanos: localizaciones $\leq$ 3 mm: 2.5%
Imbrono et al., 2008b (Brasil)	30 Periodontitis agresiva generalizada 30 Periodontitis crónica 30 Gingivitis 30 Sanos	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> diseñado autores LOD: n/d	Periodontitis agresiva generalizada: 60% Periodontitis crónica: 50% Gingivitis: 40% Sanos: 56.7%
Imbrono et al., 2008a (Brasil)	40 Periodontitis crónica	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> diseñado autores LOD: n/d	Periodontitis crónica: 82.5%
Bilichodmath et al., 2009 (India)	14 Periodontitis agresiva 10 Periodontitis crónica	Cureta	PCR múltiple <i>Primer:</i> diseñado autores LOD: n/d	Periodontitis agresiva: 7.14% Periodontitis crónica: 26.31%
Dawson et al., 2009a (EE.UU.)	65 Periodontitis crónica	Cureta	PCR en tiempo real <i>Primer:</i> gen gB y de la polimerasa CMV LOD: $1$ - $10^5$ genomas/ $\mu$ l	0.3%
Grenier et al., 2009 (Canadá)	48 sujetos 31 Periodontitis 4 Gingivitis 13 Sanos	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> diseñado autores LOD: 11 copias/ $\mu$ l	Periodontitis: 35% Gingivitis: 25% Sanos: 8% Tendencia a disminuir tras 3 meses tras tratamiento
Nibali et al., 2009 (Reino Unido)	16 Periodontitis agresiva localizada 64 Periodontitis agresiva generalizada 20 Periodontitis crónica 40 Sanos	Cureta	PCR en tiempo real <i>Primer:</i> gen gB LOD: 100 copias/ml	Periodontitis agresiva localizada: 0% Periodontitis agresiva generalizada: 0% Periodontitis crónica: 0% Sanos: 0%
Stein et al., 2013 (Alemania)	65 Periodontitis agresiva 65 Sanos	Punta de papel	PCR en tiempo real <i>Primer:</i> diseñado autores LOD: 200 genomas/ml	Periodontitis agresiva: 1.5% Sanos: 1.5%
Amaliya et al., 2015 (Indonesia)	123 sujetos	Punta de papel	PCR en tiempo real <i>Primer:</i> n/d LOD: 42.5 copias/ml	0%

LOD (*limit of detection*): límite de detección; n/d: no disponible.

**Tabla 6 . Prevalencia de VEB en muestras subgingivales mediante PCR**

<b>Autor, año (País)</b>	<b>Población</b>	<b>Método de recogida</b>	<b>Técnica PCR</b>	<b>Prevalencia VEB</b>
Contreras et al., 1996 (EE.UU.)	27 Periodontitis	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen EBNA1 (VEB-1 y 2)	Localizaciones 7-9 mm: VEB-1: 37% ; VEB-2: 22.2% Localizaciones 3-5 mm: VEB-1: 22.2%; VEB-2: 18.5%
Parra y Slots, 1996 (EE.UU.)	30 Periodontitis avanzada 26 Gingivitis leve	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen EBNA2 LOD: 50-100 copias	Periodontitis: 30% Gingivitis: 0%
Contreras et al., 1999a (EE.UU.)	140 sujetos 30 Periodontitis avanzada 38 Periodontitis moderada 31 Periodontitis leve 41 Gingivitis	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen EBNA2 (VEB-1 y VEB-2) LOD: 5-75 copias	Periodontitis avanzada: VEB-1: 20%; VEB-2: 10% Periodontitis moderada: VEB-1: 13%; VEB-2: 5.2% Periodontitis leve: VEB-1: 13%; VEB-2: 3.2% Gingivitis: VEB-1: 5%; VEB-2: 0%
Michalowicz et al., 2000 (Jamaica)	15 Periodontitis juvenil 20 Periodontitis inicial 65 Sanos	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen EBNA1 (VEB-1) LOD: n/d	Periodontitis juvenil: 33% Periodontitis leve: 45% Sanos: 17%
Ting et al., 2000 (EE.UU.)	11 Periodontitis juvenil localizada	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen EBNA2 (VEB-1 y 2) LOD: n/d	Localizaciones periodontales: VEB-1: 63.6%; VEB-2: 9.09% Localizaciones sanas: VEB-1: 18.2%; VEB-2: 0%
Kamma et al., 2001 (Grecia)	16 Periodontitis de aparición temprana en mantenimiento	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen EBNA2 (VEB-1) LOD: 100 copias	Localizaciones activas: 43.8% Localizaciones estables: 12.5%
Saygun et al., 2002 (Turquía)	30 Periodontitis crónica 21 Sanos	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen EBNA1 (VEB-1) LOD: 50-500 genomas/ml	Periodontitis: 16.7 % Sanos: 14.3%
Slots et al., 2002 (Grecia)	16 Periodontitis agresiva en mantenimiento	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen EBNA 2 (VEB-1) LOD: n/d	Localizaciones activas: 43.75% Localizaciones estables: 12.5%
Yapar et al., 2003 (Turquía)	17 Periodontitis agresiva 16 sanos 3 meses después de tratamiento mecánico	Cureta	PCR convencional <i>Primer:</i> gen EBNA2 (VEB-1) LOD: 100 genomas/ml	Periodontitis agresiva: 70.6% Sanos: 6.3%
Ling et al., 2004 (Taiwan)	20 Periodontitis 120 localizaciones	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> gen EBNA2 (VEB-1) LOD: n/d	Periodontitis: 15% 4.2% de las localizaciones
Saygun et al., 2004 (Turquía)	18 Periodontitis agresiva 16 sanos	Cureta	PCR cualitativa (VEB-1)	Periodontitis agresiva: 72.2% Sanos: 6.3%
Santangelo et al., 2004 (Italia)	22 Periodontitis de comienzo temprano 22 Periodontitis crónica 22 Sanos adultos 22 sanos jóvenes	Punta de papel	PCR múltiple <i>Primer:</i> gen EBER LOD: n/d	Periodontitis de comienzo temprano: 22.7% Periodontitis crónica: 18.1% Sanos adultos: 9% Sanos jóvenes: 9%
Tantivanich et al., 2004 (Tailandia)	50 Periodontitis 30 Sanos	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> n/d LOD: n/d	Periodontitis: 0% Sanos: 0%
Klemenc et al., 2005 (Eslovenia)	66 Periodontitis 30 sanos	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> región IE VEB LOD: n/d	Periodontitis: 43.9% Sanos: 0%

LOD (*limit of detection*): límite de detección; n/d: no disponible.

**Tabla 6 . Prevalencia de VEB en muestras subgingivales mediante PCR (continuación)**

<b>Autor, año (País)</b>	<b>Población</b>	<b>Método de recogida</b>	<b>Técnica PCR</b>	<b>Prevalencia VEB</b>
Konstantinidis et al., 2005 (Grecia)	22 Periodontitis crónica 13 Sanos	Punta de papel	PCR en tiempo real <i>Primer:</i> n/d LOD: 10 copias/μl	Periodontitis crónica: 54.5% Sanos: 23%
Kubar et al., 2005 (Turquía)	9 Periodontitis agresiva 11 Periodontitis crónica Tras desbridamiento 2 semanas previas	Cureta	PCR en tiempo real <i>Primer:</i> diseñado autores LOD: 10 <sup>7</sup> -10 <sup>1</sup> copias/ml	Periodontitis agresiva: 89% Periodontitis crónica: 46%
Saygun et al., 2005 (Turquía)	9 Periodontitis agresiva 11 Periodontitis crónica 3 meses postratamiento	Cureta	PCR en tiempo real <i>Primer:</i> diseñado autores LOD: 10 <sup>7</sup> -10 <sup>1</sup> copias/ml	Periodontitis agresiva: 65% Periodontitis crónica: 65%
Wu et al., 2007 (China)	143 Periodontitis crónica 65 Gingivitis 76 Sanos	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> diseñado autores LOD: 0,01ng	Periodontitis crónica: 63.6% Gingivitis: 32.3% Sanos: 30.3%
Chalabi et al., 2008 (Irán)	61 Periodontitis crónica 40 Sanos 160 muestras	Cureta	PCR anidada <i>Primer:</i> n/d LOD: n/d	Periodontitis: - localizaciones ≤3 mm: VEB-1: 6,6 %, VEB-2: 0% - localizaciones ≥ 6 mm: VEB-1: 73.8%; VEB-2: 4.9% Sanos: VEB-1: 2.5%; VEB-2: 0%
Imbrono et al., 2008a (Brasil)	40 Periodontitis crónica	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> diseñado autores LOD: n/d	45%
Bilichodmath et al., 2009 (India)	10 Periodontitis crónica 14 Periodontitis agresiva	Cureta	PCR múltiple <i>Primer:</i> diseñado autores LOD: n/d	Periodontitis crónica: 78.9% Periodontitis agresiva: 28.5%
Dawson et al., 2009a (EE.UU.)	65 Periodontitis crónica	Cureta	PCR en tiempo real <i>Primer:</i> gen polimerasa VEB (BALF5) LOD: 1-10 <sup>5</sup> genomas/μl	44,6% (28.2% localizaciones activas; 8.7% localizaciones sanas)
Grenier et al., 2009 (Canadá)	48 sujetos 31 Periodontitis 4 Gingivitis 13 Sanos	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> diseñado autores LOD: 25 copias/μl	Periodontitis: 3% Gingivitis: 0% Sanos: 23%
Nibali et al., 2009 (Reino Unido)	16 Periodontitis agresiva localizada 64 Periodontitis agresiva generalizada 20 Periodontitis crónica 40 Sanos	Cureta	PCR en tiempo real <i>Primer:</i> EBNA-1 LOD: 100 copias/ml	Periodontitis agresiva localizada: 25% Periodontitis agresiva generalizada: 3.1% Periodontitis crónica: 0% Sanos: 10.3%
Kato et al., 2013 (Japón)	85 Periodontitis crónica 20 Sanos	Punta de papel	PCR anidada <i>Primer:</i> EBNA2 LOD: n/d	Periodontitis: Localizaciones ≤3mm: 48% Localizaciones ≥ 5 mm: 66% Sanos: 45%
Stein et al., 2013 (Alemania)	65 Periodontitis agresiva 65 Sanos	Punta de papel	PCR en tiempo real <i>Primer:</i> diseñado autores LOD: 500 genomas/ml	Periodontitis agresiva: 10.8% Sanos: 13.9%
Amaliya et al., 2015 (Indonesia)	123 sujetos	Punta de papel	PCR en tiempo real <i>Primer:</i> n/d LOD: 157 copias/ml	75%

LOD (*limit of detection*): límite de detección; n/d: no disponible.

### **3.2. Asociación entre el CMV y el VEB**

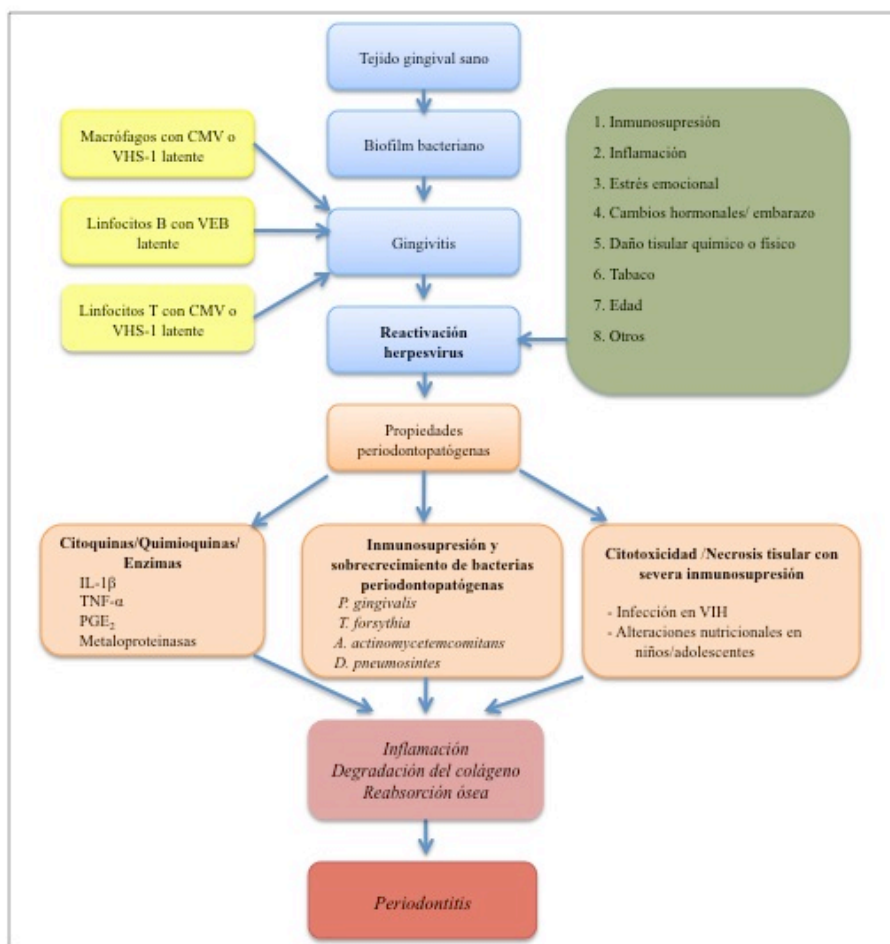
Se ha propuesto que la coinfección CMV-VEB podría estar relacionada con la severidad y extensión de la enfermedad periodontal. En este sentido, en un estudio realizado en Grecia en pacientes con periodontitis de aparición temprana en fase de mantenimiento, observan que la coinfección por ambos virus (43.8%) está asociada a aquellas localizaciones con sangrado al sondaje y con un ritmo de progresión más rápido que aquellas en las que únicamente se aísla uno de los dos virus (Kamma et al., 2001). Otros autores también observan asociación entre el CMV y el VEB en periodontitis agresiva (Ting et al., 2000; Yapar et al., 2003; Imbronito et al., 2008b) y en periodontitis crónica (Contreras et al., 1996). Sin embargo, otros estudios no encuentran relación sinérgica entre ambos virus (Michalowicz et al., 2000; Slots et al., 2002).

También se han descrito coinfecciones de ambos virus con el VHS-1 en sujetos con periodontitis agresiva (Kamma et al., 2001; Ling et al., 2004; Imbronito et al., 2008b) y en bolsas profundas de pacientes con periodontitis crónica (Contreras et al., 1996). Rotola et al. (Rotola et al., 2008), en biopsias gingivales de sujetos con periodontitis crónica y agresiva, encuentran coinfección entre el VEB y el VHH-7.

### **3.3. Posibles mecanismos patogénicos que explican la relación entre la infección por CMV y el VEB y las enfermedades periodontales**

Basándose en el hecho de que parece que existe una posible relación entre la infección por el CMV y el VEB y las enfermedades periodontales, se han propuesto al menos tres mecanismos patogénicos, que actuarían solos o probablemente en combinación, y que podrían explicar la contribución de dichos virus en la enfermedad (Slots, 2010) (Figura 10).





**Figura 10. Esquema etiopatogénico interacción herpesvirus-bacterias periodontopatógenas en periodontitis.**

Modificado de: Slots, 2010

### 3.3.1. Daño directo

Los herpesvirus pueden causar un efecto citotóxico directo en fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y células inflamatorias, incluyendo leucocitos PMN, linfocitos, macrófagos y, posiblemente, en osteoblastos (Contreras y Slots, 2000b; Slots, 2005; Slots, 2010; Vincent-Bugnas et al., 2013; Contreras et al., 2014).

Estudios *in vitro* (Botero et al., 2008a) e *in vivo* (Saboia-Dantas et al., 2008) muestran que los fibroblastos infectados por CMV expresan menor cantidad de proteínas colágenas para sintetizar colágeno y una menor densidad del mismo, lo cual podría interferir en el recambio y reparación del periodonto. En este sentido, se ha observado que la infección por estos virus de las membranas empleadas en cirugía de regeneración

periodontal (Smith MacDonald et al., 1998) o de los injertos óseos en implantes (Verdugo et al., 2012), empeora los resultados postquirúrgicos.

### 3.3.2. Alteración del sistema inmune

Los herpesvirus pueden inducir una respuesta inmune alterada, e incluso excesiva, en las células del huésped (Mogensen y Paludan, 2001). Así, el CMV puede aumentar la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y de otras citoquinas por monocitos y macrófagos (Contreras et al., 1999b; Mogensen y Paludan, 2001; Wara-aswapati et al., 2003), mediadores que tienen un papel importante en periodontitis debido a su capacidad de inducir reabsorción ósea e interferir en la formación de colágeno (Kornman et al., 1997b; Cekici et al., 2014). En un estudio *in vitro*, Botero et al. (Botero et al., 2008b) observan que los fibroblastos gingivales infectados por CMV sintetizan gran cantidad de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, fundamentalmente IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ .

El VEB puede actuar como un potente activador de la proliferación policlonal de linfocitos B (Contreras et al., 1999b), capaces de estimular la proliferación y diferenciación de células secretoras de inmunoglobulinas, hecho asociado con la progresión de ciertos tipos de periodontitis (Gemmell y Seymour, 1998). Por su parte, el CMV puede modular las funciones de los linfocitos T antígeno-específicos, con un aumento en las células T CD8 $^{+}$ , produciendo una alteración en la respuesta inmune celular (Sester et al., 2002). Además, el CMV puede evadir su detección por el sistema inmune, por ejemplo, induciendo la producción de IL-10 por monocitos, lo cual inhibiría la expresión del antígeno MHC-II (Kotwal, 1997; Redpath et al., 1999).

También se han observado alteraciones en las funciones fagocíticas y bactericidas de los leucocitos PMN, células clave en la respuesta de defensa innata contra las bacterias periodontopatógenas, en sujetos portadores de herpesvirus en los linfocitos y en células epiteliales orales (Ongrádi et al., 1987). Estudios *in vitro* también muestran que el CMV y el VEB pueden inhibir la función fagocítica de los macrófagos, lo cual podría favorecer el sobrecrecimiento de bacterias periodontopatógenas (Lin y Li, 2009).

### 3.3.3. Favorecer la adherencia y colonización de bacterias periodontopatógenas

La relación entre el CMV y el VEB con ciertas bacterias periodontopatógenas ha sido objeto de estudio por diferentes autores (Tabla 7), tanto en periodontitis crónica como en periodontitis agresiva, proponiendo diferentes mecanismos de asociación (Contreras et al., 1999a; Michalowicz et al., 2000; Ting et al., 2000; Kamma et al., 2001; Nowzari et al., 2001; Slots et al., 2002; Sugano et al., 2004; Botero et al., 2007; Saygun et al., 2004a; Imbronito et al., 2008b; Saygun et al., 2008).

Se ha sugerido que la infección de las células del epitelio oral por estos virus conllevaría a la disrupción de la barrera epitelial del periodonto, favoreciendo el acceso de bacterias patógenas a los tejidos profundos (Contreras y Slots, 2000b; Contreras et al., 2014). Además, ciertas proteínas expresadas en la superficie de las células infectadas por los herpesvirus pueden servir como receptores para bacterias (Bakaletz, 1995). En un estudio *in vitro*, Teughels et al. (Teughels et al., 2007), hallan cepas de *A. actinomycetemcomitans* con mayor capacidad de adherencia a las células epiteliales infectadas por CMV que a las no infectadas.

En relación a la asociación CMV y *P. gingivalis*, en un estudio experimental en roedores, se observa que dicha coinfección induce diferentes daños hepáticos y mayor mortalidad que la monoinfección por cada uno de los agentes (Stern et al., 2004).

Con respecto a la coinfección entre VEB y *P. gingivalis*, se ha sugerido que la reactivación del VEB produciría una alteración en el sistema inmune del huésped, permitiendo el sobrecrecimiento de *P. gingivalis*, lo cual, a su vez, también podría tener potencial de reactivar al VEB (Sugano et al., 2004). Estudios *in vitro* observan que el ácido butírico, metabolito producido por *P. gingivalis*, puede activar la transcripción de ZEBRA, proteína asociada a la reactivación del VEB (Imai et al., 2012).

Además, el LPS de las bacterias Gram-negativas podría actuar de forma sinérgica con el CMV, mediante la estimulación de la transcripción del gen de IL-1 $\beta$ , aumentando el nivel de dicha interleuquina en las localizaciones periodontalmente afectadas (Wara-aswapati et al., 2003).

**Tabla 7. Estudios que han observado asociación entre CMV, VEB y bacterias periodontopatógenas en periodontitis**

<b>Herpesvirus</b>	<b>Bacterias periodontopatógenas</b>	<b>Estudio</b>
Citomegalovirus	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Contreras et al., 1999 Michalowicz et al., 2000 Kamma et al., 2001 Saygun et al., 2004 Botero et al., 2007 Saygun et al., 2008
	<i>Tannerella forsythia</i>	Contreras et al., 1999 Saygun et al., 2004 Botero et al., 2007 Imbronito et al., 2008 Saygun et al., 2008
	<i>Prevotella intermedia</i>	Saygun et al., 2004 Botero et al., 2007
	<i>Prevotella nigrescens</i>	Contreras et al., 1999 Botero et al., 2007
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Michalowicz et al., 2000 Ting et al., 2000 Nowzari et al., 2001
	<i>Campylobacter rectus</i>	Saygun et al., 2004
	<i>Treponema denticola</i>	Contreras et al., 1999
	<i>Eikenella corrodens</i>	Botero et al., 2007
Epstein-Barr	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Kamma et al., 2001 Slots et al., 2002 Contreras et al., 1999 Kamma et al., 2001 Saygun et al., 2004 Sugano et al., 2004 Imbronito et al., 2008b Saygun et al., 2008
	<i>Tannerella forsythia</i>	Contreras et al., 1999 Saygun et al., 2004 Saygun et al., 2008
	<i>Prevotella intermedia</i>	Contreras et al., 1999 Imbronito et al., 2008
	<i>Prevotella nigrescens</i>	Contreras et al., 1999
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Michalowicz et al., 2000
	<i>Campylobacter rectus</i>	Saygun et al., 2008
	<i>Treponema denticola</i>	Contreras et al., 1999

#### 4. UTILIDAD DE LA SALIVA EN MICROBIOLOGÍA PERIODONTAL

La saliva es una mezcla de fluidos orales, entre los que se incluyen tanto las secreciones de las glándulas salivales mayores y menores, como otros componentes de origen no salivar: FCG, secreciones nasales y bronquiales, suero y sangre derivados de lesiones intraorales; bacterias y sus productos, virus, hongos, células epiteliales descamadas, otros componentes celulares y restos de alimentos (Kaufman y Lamster, 2002).

Los dos métodos principales para recoger la saliva son (Navazesh, 1993):

- El método de drenaje, en el cual la saliva gotea desde el labio inferior.
- El método de esputo, en el cual el sujeto escupe en el tubo de recolección.

Actualmente, ha cobrado especial interés la saliva como método diagnóstico de diversas enfermedades, especialmente a partir del desarrollo de las técnicas de detección molecular de ciertos biomarcadores salivales. En este sentido, se ha evaluado su aplicación en el diagnóstico de ciertos tipos de cáncer, en enfermedades congénitas, alteraciones hormonales y en enfermedades cardiovasculares (Boppana et al., 2010; Boppana et al., 2011; Zahran et al., 2015). También en infecciones bacterianas, fúngicas o víricas, como el VIH, así como elemento para monitorizar la evolución de determinadas patologías o dosificación de ciertos fármacos (Streckfus y Bigler, 2002; Loo et al., 2010; Miller et al., 2010; Giannobile et al., 2011; Liu y Duan, 2012).

En Periodoncia, se ha aplicado en el diagnóstico microbiológico de bacterias periodontopatógenas (Asikainen et al., 1991; Mättö et al., 1998; Umeda et al., 1998b; Müller et al., 2001; Boutaga et al., 2007; Paju et al., 2009; Martínez-Pabón et al., 2010; Belstrøm et al., 2014; Haririan et al., 2014; Liljestrand et al., 2014; Salminen et al., 2014) y de herpesvirus (Idesawa et al., 2004; Imbronito et al., 2008a; Dawson et al., 2009b; Sahin et al., 2009; Slots y Slots, 2011; Bilder et al., 2013), así como método para valorar la progresión de las enfermedades periodontales (Kinney et al., 2011; Gursoy et al., 2013; Rathnayake et al., 2013; Liljestrand et al., 2014; Zamora-Perez et al., 2015).

Como principales ventajas de emplear este tipo de muestra, podemos señalar la sencillez de la toma por los profesionales, por los mismos individuos, o por familiares en niños. Además, es un método no invasivo, reduce la ansiedad al paciente y es más seguro que la venopunción, especialmente en pacientes con enfermedades hemorrágicas o en los que por razones culturales, por edad o discapacidad no permiten la toma de muestras en sangre (Giannobile et al., 2011; Slots y Slots., 2011).

Como limitaciones, diversos investigadores han señalado que ciertos componentes de la saliva, como enzimas proteolíticas o alimentos, puedan ser inhibidores de la amplificación de la PCR, dando lugar a falsos negativos (Rossen et al., 1992; Amicosante et al., 1995; Umeda et al., 1998b; Pitetti et al., 2003; Boutaga et al., 2007).

Además, algunos biomarcadores en saliva muestran significativas fluctuaciones y pueden verse alterados por factores locales, como el tabaco, y sistémicos, como la diabetes o las enfermedades cardiovasculares, limitando así su utilidad diagnóstica (Furuholm et al., 2006; Thomas et al., 2009; Costa et al., 2010; Rathnayake et al., 2013).

#### **4.1. Saliva como método diagnóstico de herpesvirus (CMV y VEB)**

La saliva es una de las secreciones corporales por la que los herpesvirus pueden ser excretados y transmitidos a otros sujetos. Tras la primoinfección, la reinfección por una cepa distinta o en la reactivación de estos virus, durante meses e incluso años, se pueden detectar genomas virales en saliva. En la mayor parte de los individuos, esta situación es asintomática (Grinde, 2013).

La mayoría de individuos sistémicamente sanos liberan ADN de estos virus en saliva. Miller et al. (Miller et al., 2005) analizando diferentes estudios, exponen frecuencias medias de detección en saliva del 79% para el VHH-7, del 62% para el VHH-6, del 31% para el VEB, del 10.8% para el VVZ; del 6.0 % para el VHS-1, del 0.6% para el VHS-2, del 0.6% para el CMV y del 0% para el VHH-8. Señalan que la heterogeneidad de las prevalencias encontradas en los estudios pueden ser debidas a diferencias poblacionales, diferentes cepas de cada virus, a razones metodológicas en la recogida de saliva y en la técnica de análisis de los ácidos nucleicos, así como al estado sistémico del paciente. Respecto a este último punto, se han hallado mayores frecuencias de detección de herpesvirus en saliva en individuos inmunocomprometidos, como en pacientes VIH (Gautheret-Dejean et al., 1997; Miller et al., 2006).

En relación a los virus que nos ocupan en este trabajo, existe cierta controversia sobre cuál es el origen del VEB y del CMV en la saliva. Se ha propuesto que el epitelio de la orofaringe podría ser una de las fuentes fundamentales del VEB en saliva (Pegtél et al., 2004) y, aunque se pensó que las glándulas salivales podrían ser el nicho principal de los herpesvirus (Morgan et al., 1979), se ha observado que las glándulas salivales contienen escasas cantidades de CMV (Mariette et al., 1996) y de VEB (Merne y Syrjänen, 1996). Más recientemente, se ha sugerido que las bolsas periodontales podrían ser un nicho de procedencia de estos virus en la saliva (Saygun et al., 2005; Dawson et al., 2009b; Sahin et al., 2009).

Los estudios de prevalencia del CMV en saliva en enfermedad periodontal son escasos y con resultados dispares. En periodontitis crónica, se han reportado prevalencias del 75% en Brasil (Imbronito et al., 2008a), entre el 50% y el 65% en Turquía (Saygun et al., 2005; Sahin et al., 2009), del 15% en Israel (Bilder et al., 2013) y del 1.5% en Estados Unidos (Dawson et al., 2009b). Dada la alta correlación en frecuencia de detección de dicho patógeno en pacientes con periodontitis, en saliva y en muestras subgingivales (Saygun et al., 2005; Imbronito et al., 2008a), y la baja prevalencia en sanos o sujetos edéntulos (Sahin et al., 2009; Bilder et al., 2013), se ha propuesto que las bolsas periodontales podrían ser una fuente de procedencia del CMV en saliva (Saygun et al., 2005; Imbronito et al., 2008a; Dawson et al., 2009b; Sahin et al., 2009).

Respecto al VEB, los resultados son aún más variables, aunque parece ser más prevalente en saliva tanto en los individuos con periodontitis como sanos. En Turquía, encuentran VEB en saliva en el 65% de los pacientes con periodontitis (Saygun et al., 2005), frecuencia algo inferior a la encontrada años posteriores por el mismo grupo, que hallan una prevalencia del 79% en periodontitis, en el 33% en gingivitis y en el 54% de los pacientes edéntulos (Sahin et al., 2009). En Israel, hallan ADN de este virus en saliva de pacientes periodontales y en sanos, con una frecuencia de detección del 40% y 36.8%, respectivamente (Bilder et al., 2013). En Brasil, empleando PCR anidada, se ha detectado VEB-1 en el 37.5% de los pacientes con periodontitis, con una alta correlación con su presencia en muestra subgingival (45%) (Imbronito et al., 2008a). En Estados Unidos, observan una frecuencia de detección mayor, en el 81.5% de la saliva de los pacientes con periodontitis moderada-avanzada y en menor frecuencia en muestras de placa subgingival (41.5%) (Dawson et al., 2009b). En Japón, en dos estudios publicados, hallan una prevalencia del 48.5% en pacientes con periodontitis crónica (Idesawa et al., 2004; Sugano et al., 2004) .

Debido a que el VEB se encuentra en salud y enfermedad, e incluso en sujetos edéntulos, se ha propuesto que su presencia en saliva podría tener otra procedencia diferente de las bolsas periodontales (Sahin et al., 2009; Bilder et al., 2013), aunque se encuentre con una alta correlación a nivel subgingival y en saliva (Dawson et al., 2009b).

Imbronito et al. (Imbronito et al., 2008a), al comparar la muestra de saliva y sangre periférica con la muestra subgingival en sujetos con periodontitis crónica para determinar VEB, observan una baja sensibilidad y especificidad para la muestra de saliva, por lo que concluyen que para el diagnóstico de dicho patógeno no debería tomarse solo la muestra en saliva. Sin embargo, para el CMV, obtienen una sensibilidad y especificidad mayor (82% y 57%, respectivamente), similares a las obtenidas en muestras de sangre periférica (88% y 43%, respectivamente), por lo que sugieren que la saliva puede ser útil para la determinación del CMV.

También en otros campos de la medicina, la saliva está siendo considerada un método diagnóstico alternativo o complementario a los convencionales para el CMV, especialmente en individuos inmunocomprometidos, dado su alta excreción en dicho fluido y la positiva relación riesgo/beneficio (Gautheret-Dejean et al., 1997; Miller et al., 2006).

#### **4.2. Saliva como método diagnóstico de bacterias periodontopatógenas**

La saliva alberga más de  $10^8$  bacterias/ml y es un nicho habitual de microorganismos prodecentes del biofilm supra y subgingival, del dorso de la lengua y de otras superficies de la mucosa oral, siendo la lengua una de los principales fuentes de la mayor parte de las bacterias salivales (van der Velden et al., 1986). Muchas de las bacterias periodontopatógenas, como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *C. rectus* y *P. micra* son frecuentemente halladas en saliva (Asikainen et al., 1991; Danser et al., 1994; von Troil-Lindén et al., 1995; Umeda et al., 1998b; Cortelli et al., 2005; Belstrøm et al., 2014; Boutaga et al., 2007; Haririan et al., 2014; Liljestrand et al., 2014). También se han detectado otras bacterias, como *Prevotella nigrescens* y *T. denticola* (Umeda et al., 1998b), *Leptotrichia spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Bacteroides gracilis* y *Prevotella loescheii* (Könönen et al., 1994), *Eubacterium nodatum* y *Campylobacter gracilis* (Haririan et al., 2014), así como bacterias relacionadas con la caries, como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y especies de *Lactobacillus* (Daraut et al., 2002).

Aunque se ha comprobado la superioridad del nicho subgingival y su relación como nicho primario de bacterias periodontopatógenas (Haffajee y Socransky, 1992; Danser



et al., 1994; Haffajee et al., 1998; de Waal et al., 2014), algunos autores observan persistencia de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* en saliva de sujetos sometidos a extracción de todos los dientes, tres meses después, (de Waal et al., 2014), e incluso, esta última bacteria, al año (Quirynen y van Assche, 2011).

Gracias a la sencillez de toma de la saliva y a los avances de las técnicas moleculares de PCR, se ha propuesto como método diagnóstico alternativo o complementario en microbiología periodontal. En este sentido, Umeda et al. (Umeda et al., 1998b) han observado que el análisis de muestras salivales mediante PCR puede ser superior a las muestras subgingivales para detectar determinadas bacterias, como *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* y *T. denticola*. Sin embargo, aunque obtienen resultados razonables para *A. actinomycetemcomitans* y *T. forsythia*, su detección es menor en saliva que en muestra subgingival, por lo que concluyen que para una correcta determinación de estos dos patógenos se requiere la combinación de ambos tipos de muestras. Estos resultados también son observados con PCR por Cortelli et al. (Cortelli et al., 2005), los cuales obtienen una frecuencia de detección inferior para *A. actinomycetemcomitans* en saliva que en la muestra subgingival, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Empleando tecnología de hibridación ADN-ADN en tablero de ajedrez, Mager et al. (Mager et al., 2003) también hallan con mayor frecuencia *T. forsythia* en muestra subgingival que en saliva.

Empleando métodos más sensibles, como la PCR en tiempo real, Boutaga et al. (Boutaga et al., 2007), observan mayor frecuencia de detección para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia* en muestra de lavado bucal (enjuague con suero), aunque en menor proporción que en muestra subgingival. Sin embargo, Saygun et al. (Saygun et al., 2011) hallan que la proporción de patógenos en muestra de saliva y subgingival es similar para *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* y *C. rectus*, mayor en saliva para *P. gingivalis*, e inferior que en muestra subgingival para *T. forsythia*.

Estudios recientes han propuesto que el recuento de *P. gingivalis* en saliva podría emplearse como marcador diagnóstico o indicador de riesgo de periodontitis (Gursoy et al., 2011; Saygun et al., 2011; Lilestrand et al., 2014; Salminen et al., 2014), lo cual podría ser especialmente útil en estudios epidemiológicos a gran escala (Gursoy et al., 2011).

Por tanto, aunque los resultados de los estudios presentan cierta heterogeneidad en la calidad y cantidad de análisis para las distintas bacterias, posiblemente debido a diferencias en la prevalencia de periodontopatógenos según la población de estudio, variantes de cada especie bacteriana, método de recogida de saliva y variables metodológicas empleadas, los estudios muestran que la saliva puede ser un nicho adecuado para el estudio del biofilm subgingival e, incluso, emplearse como marcador diagnóstico de periodontitis en estudios epidemiológicos.



## **II. JUSTIFICACIÓN**

---



Hasta la fecha, las bacterias se han considerado el factor etiológico principal para el desarrollo de las enfermedades periodontales, y su interacción con el huésped es la base de la etiopatogenia de estos procesos.

En los últimos 15 años, se ha sugerido una posible implicación de algunos herpesvirus, como el CMV y el VEB, en el inicio y progresión de las enfermedades gingivales y periodontales, aunque en la mayoría de los trabajos no se han podido obtener resultados concluyentes. Sin embargo, no hay estudios en la población española que confirmen estos hallazgos, por lo que sería necesario realizar un estudio y valorar la literatura disponible para determinar si existen o no evidencias de asociación entre la infección por estos virus y las enfermedades periodontales.

Por otro lado, el objetivo fundamental para realizar una correcta evaluación microbiológica es la obtención de una muestra representativa de los patógenos periodontales presentes en la boca del paciente. Aunque el método de referencia actual es la toma de muestras en FCG, se ha comparado la capacidad de otros nichos orales, como la saliva, dadas sus ventajas en la sencillez y rapidez en la toma. En este sentido, creemos que es importante evaluar su eficacia, en relación a la muestra en FCG, para la detección tanto de herpesvirus como de bacterias periodontopatógenas.



### III. HIPÓTESIS

---





**HIPÓTESIS 1**

H<sub>0</sub>: La prevalencia de CMV y de VEB debe ser alta en pacientes con periodontitis crónica.

H<sub>1</sub>: La prevalencia de CMV y de VEB no debe ser alta en pacientes con periodontitis crónica.

**HIPÓTESIS 2**

H<sub>0</sub>: La detección de CMV y VEB está asociada con la presencia de bacterias periodontopatógenas en sujetos con periodontitis crónica.

H<sub>1</sub>: La detección de CMV y VEB no está asociada con la presencia de bacterias periodontopatógenas en sujetos con periodontitis crónica.

**HIPÓTESIS 3**

H<sub>0</sub>: La presencia de CMV, VEB y bacterias periodontopatógenas está asociada con los parámetros clínicos de enfermedad periodontal.

H<sub>1</sub>: La presencia de CMV, VEB y bacterias periodontopatógenas no está asociada con los parámetros clínicos de enfermedad periodontal.

**HIPÓTESIS 4**

H<sub>0</sub>: La saliva podría emplearse como un método diagnóstico alternativo a la toma de muestras en FCG para la detección de CMV, VEB y bacterias periodontopatógenas.

H<sub>1</sub>: La saliva no podría utilizarse como un método diagnóstico alternativo a la toma de muestras en FCG para la detección de CMV, VEB y bacterias periodontopatógenas.



## **IV. OBJETIVOS**

---



El propósito principal de este estudio fue determinar la prevalencia de CMV y VEB, mediante PCR en tiempo real, en muestras de FCG y saliva, en sujetos con periodontitis crónica y controles sanos.

También se plantearon otros objetivos secundarios:

1. Analizar las posibles asociaciones existentes entre estos dos virus con cinco patógenos periodontales (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola*), en muestras de FCG y saliva.
2. Estudiar la posible asociación entre la presencia de CMV, VEB y bacterias periodontopatógenas con los parámetros clínicos de enfermedad periodontal, en FCG y saliva.
3. Evaluar la concordancia entre la muestra de FCG y saliva para la detección de CMV, VEB y bacterias periodontopatógenas, y determinar su utilidad como método diagnóstico para dichos microorganismos.



**v. MATERIALES Y**

**MÉTODOS**





## 1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se incluyeron dos grupos de estudio:

- **Grupo periodontitis crónica:** se seleccionaron 24 sujetos consecutivos, con diagnóstico de periodontitis crónica generalizada moderada, de entre los que habitualmente acuden a la clínica del Postgrado de Periodoncia del Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid
- **Grupo control:** constituido por 24 sujetos periodontalmente sanos que acudieron al Servicio de Recepción de Pacientes de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, así como por trabajadores o estudiantes de dicha institución.

Los sujetos de ambos grupos cumplían los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

### 1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Residentes en la Comunidad Autónoma de Madrid.
- Edad entre 20-70 años.
- Étnia: caucásica.
- Presencia de al menos 16 dientes, excluyendo los terceros molares, con un mínimo de tres dientes en cada cuadrante.
- Grupo periodontitis: pacientes diagnosticados de periodontitis crónica, según la clasificación de la AAP de 1999 (Armitage, 1999), con evidencia radiográfica de pérdida ósea en cada cuadrante, y con cuatro localizaciones o más en cada cuadrante, con profundidad de sondaje mayor o igual a 4 mm y pérdida de inserción mayor de 3 mm.
- Grupo control: sujetos periodontalmente sanos, con sangrado al sondaje inferior al 25% y sin pérdida de inserción (menos de tres localizaciones con profundidad de sondaje mayor de 3 mm o con pérdida de inserción mayor de 2 mm).

## **1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

- Hábito tabáquico.
- Embarazadas o en periodo de lactancia.
- Patología sistémica y/o medicación con repercusión periodontal.
- Necesidad de profilaxis antibiótica para la evaluación periodontal.
- Padecer patologías dentales o periodontales agudas.
- Pacientes que hubieran recibido profilaxis profesional o tratamiento periodontal activo en los 6 meses previos.
- Pacientes que hubieran estado sometidos a tratamiento con antibióticos sistémicos en los últimos dos meses.
- Empleo de colutorios en el mes previo.

Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado, aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, después de ser informados detalladamente acerca del propósito del estudio.

## **2. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se realizó un estudio epidemiológico clínico y microbiológico transversal, con un diseño de casos-contrroles. Todos los sujetos fueron reclutados entre Septiembre del 2013 y Mayo del 2014.

El estudio constó de dos visitas:

### **2.1. Visita de selección**

Durante esta visita, se evaluaron a los sujetos de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión anteriormente descritos. Si cumplían estos requisitos y daban su autorización para participar en el estudio, se les citaba para la visita inicial del estudio.

Se pidió a los sujetos que 2 horas antes de la visita inicial, no ingirieran ningún alimento o bebida.

## **2.2. Visita inicial**

Se realizó la recogida de muestras de saliva y FCG para el análisis microbiológico y el registro de los parámetros clínicos, en el siguiente orden:

1. Recogida de saliva.
2. Índice de placa (O'Leary et al., 1972).
3. Profundidad de sondaje.
4. Nivel clínico de inserción.
5. Sangrado al sondaje (Mühlemann y Son, 1971).
6. Toma de muestras de FCG.

## **3. PARÁMETROS CLÍNICOS**

El registro de los datos clínicos se realizó por el mismo examinador calibrado, después de la toma de muestras de saliva, para evitar la potencial contaminación con sangre. Se evaluaron las siguientes variables clínicas en 6 localizaciones por diente (DV-distovestibular, V-vestibular, MV-mesiovestibular, DL-distolingual, L-lingual, ML-mesiolingual).

### **3.1. Índice de placa**

Se valoró la presencia o ausencia de placa según el índice dicotómico de O'Leary et al., 1972.

### **3.2. Profundidad de sondaje y nivel clínico de inserción**

Estas mediciones se realizaron manualmente con una sonda periodontal PCP15 (Hu-Friedy Co., Chicago, IL., EE.UU.).

### **3.3. Sangrado al sondaje**

La presencia o ausencia de sangrado se valoró mediante la inspección visual, durante los 30 segundos siguientes después de haber registrado la profundidad de sondaje, según el índice dicotómico de Mühlemann y Son, 1971.

## **4. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO**

### **4.1. Recogida de muestras**

#### **4.1.1. Muestras de saliva**

Las muestras de saliva fueron tomadas en primer lugar para evitar una potencial contaminación con sangre.

Se realizó en el sillón dental, con el respaldo vertical y la cabeza ligeramente inclinada hacia delante. Tras un enjuague con agua durante un minuto, se pidió a los pacientes que cerraran la boca y que al minuto tragarán saliva (periodo de equilibrio) (Mandel y Wotman, 1976). Tras ello, volvían a cerrar la boca y mantenían en su interior la saliva producida, dejándola después fluir sobre un tubo de cristal estéril, durante un total de dos minutos, hasta obtener 15 ml de saliva no estimulada.

Las muestras fueron congeladas a una temperatura de -80 °C y almacenadas hasta su posterior análisis.

#### **4.1.2. Muestras de FCG**

En los pacientes del grupo periodontitis, en cada cuadrante, se seleccionó la localización más accesible, con mayor profundidad de sondaje y con sangrado tras el sondaje (Mombelli et al., 1991). En el grupo control, se eligió como localización mesiovestibular de los primeros molares. Se registraron específicamente las variables clínicas de las localizaciones seleccionadas, como la presencia de placa, sangrado al sondaje, profundidad de sondaje y recesión gingival.

Cada localización se aisló convenientemente con rollos de algodón, para evitar la posible contaminación con saliva, se eliminó la placa o cálculo supragingival con curetas y bolas de algodón estériles, y se secó con chorro de aire. La toma de la muestra se realizó con una punta de papel estéril (Maillefer, Ballaigues, Suiza), tamaño 30, colocada durante 20 segundos lo más subgingival posible (Lau et al., 2004). Las puntas de papel de las 4 localizaciones seleccionadas se introdujeron en un único tubo eppendorf sin filtro (Lida Manufacturing Corp, N, EEUU).

Las muestras fueron congeladas a una temperatura de -80 °C y almacenadas hasta su posterior análisis.

## 4.2. Procesado de las muestras

El procesado de las muestras se realizó en la Unidad de Microbiología y Virología Molecular de los Laboratorios de Análisis Dr. Echevarne (Barcelona, España).

Para el análisis de ADN del CMV y del VEB, tanto en FCG y saliva, se efectuó una PCR en tiempo real. Para la identificación de los patógenos periodontales (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola*), en muestras de FCG y saliva, se realizó una PCR convencional seguida de la identificación por hibridación reversa en tira colorimétrica.

### 4.2.1. Extracción del ADN de las muestras de FCG y saliva

Las muestras congeladas fueron calentadas a temperatura ambiente. La extracción del ADN vírico y bacteriano, a partir de las muestras de FCG y saliva, se realizó mediante el kit comercial QIAamp Mini kit (Qiagen, Venlo, Holanda), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El esquema del procedimiento realizado se describe en la Figura 11:

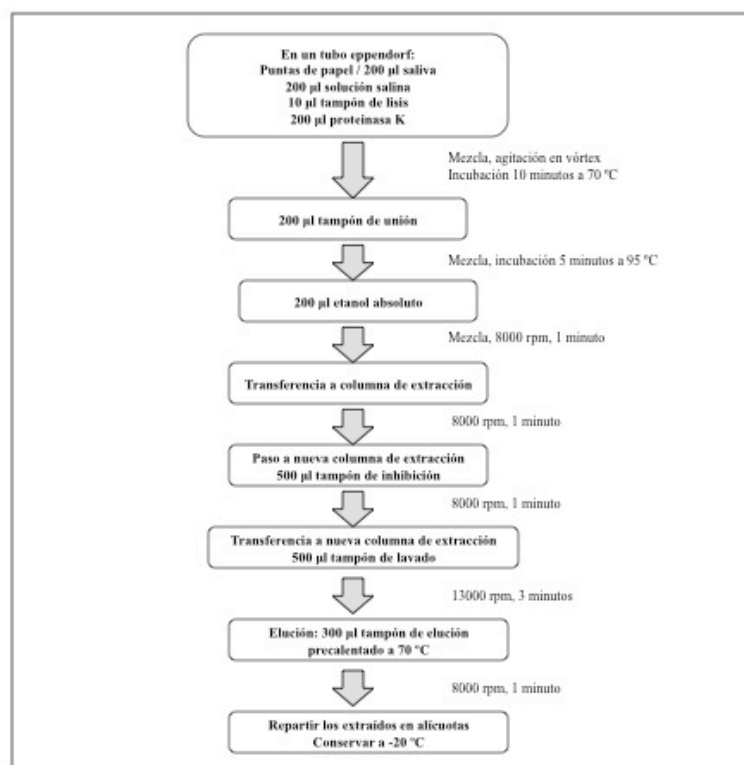


Figura 11. Extracción de ADN en muestras de FCG y saliva.

#### 4.2.2. Detección de ADN de CMV y VEB en muestras de FCG y saliva, mediante PCR en tiempo real

Se empleó el kit *RealCycler* CMEB<sup>®</sup> (Progenie Molecular, Valencia, España), test que permite la detección cualitativa mediante PCR en tiempo real del ADN del CMV y del VEB. El test incluye la mezcla de reacción AmpliMix, dispensada en tubos de amplificación, que contiene los iniciadores específicos para amplificar un fragmento de la secuencia del gen gB del CMV y del gen LMP1 del VEB. Además, incluye un control interno de amplificación, para prevenir los falsos negativos debidos a la inhibición de la reacción (Figura 12).



**Figura 12. Kit *RealCycler* CMEB<sup>®</sup> (Progenie Molecular, Valencia, España).**

El método *RealCycler* CMEB<sup>®</sup> emplea sondas marcadas con fluoróforos, que emiten fluorescencia en caso de amplificación. La amplificación del CMV, del VEB y la del control interno se detectan en los canales correspondientes al fluoróforo TxR, al fluoróforo FAM y al fluoróforo Alx532, respectivamente.

Según el fabricante, la sensibilidad de la técnica es determinada por el método de dilución límite y obtenida en ensayos repetitivos con una reproducibilidad superior al 95%. El límite de detección para el CMV fue de 1 copia/μl y de 10 copias/μl para el VEB.

#### 4.2.2.1. Amplificación

Primeramente, se descongelaron los tubos AmpliMix necesarios para amplificar las muestras y el control positivo. Posteriormente, se añadieron 8  $\mu$ l del ADN de cada muestra o control en cada tubo. Se procedió a la centrifugación de los tubos para que la reacción pasara a la zona óptica.

Como termociclador se empleó el SmartCycler® (Cepheid, Sunnyvale, California, EE.UU.) (Figura 13). Una vez se colocaron los tubos en el equipo, se asignó el protocolo de amplificación “CMEB” a las muestras y al control positivo. La mezcla de reacción fue sometida a un programa de un ciclo de desnaturalización de la muestra y activación, a una temperatura de 95 °C durante 15 minutos, seguido de un programa de 45 ciclos de amplificación de 15 segundos a 95 °C; 30 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72 °C. En todos los casos se siguieron las instrucciones del fabricante.



Figura 13. Termociclador SmartCycler® (Cepheid, Sunnyvale, California, EE.UU.).

#### 4.2.2.2. Interpretación de los resultados

El resultado obtenido en cada muestra fue analizado con el *software* GeneXpert Dx 4.6 (Cepheid, Sunnyvale, California, EE.UU.) (Figura 14), teniendo en cuenta la combinación de señales indicada en la siguiente tabla proporcionada por el fabricante del kit *RealCycler* CMEB® (Tabla 8):



Canales			Interpretación
FAM	TxR	Alx532/HEX	
POS	NEG	Indiferente	POSITIVO EBV
NEG	POS	Indiferente	POSITIVO CMV
POS	POS	Indiferente	POSITIVO EBV y CMV
NEG	NEG	POS	NO SE DETECTA
NEG	NEG	NEG	NO VALORABLE

Tabla 8. Interpretación de resultados según el fabricante del kit *RealCycler CMEB*<sup>®</sup> (Progenie Molecular, Valencia, España).

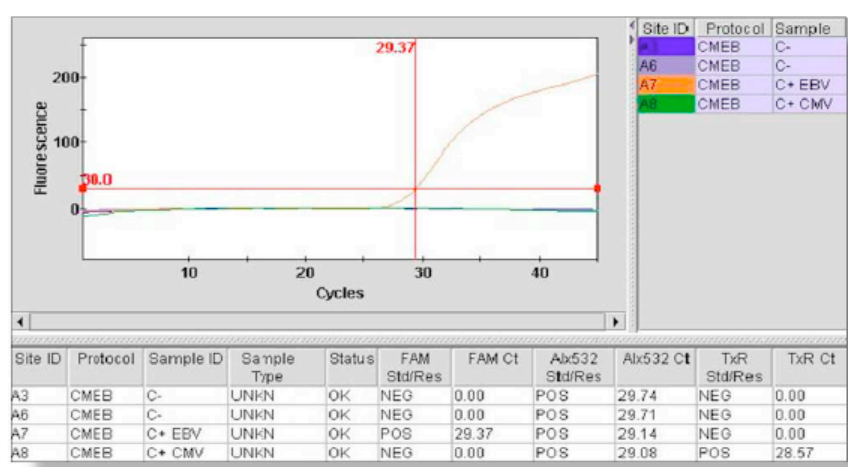
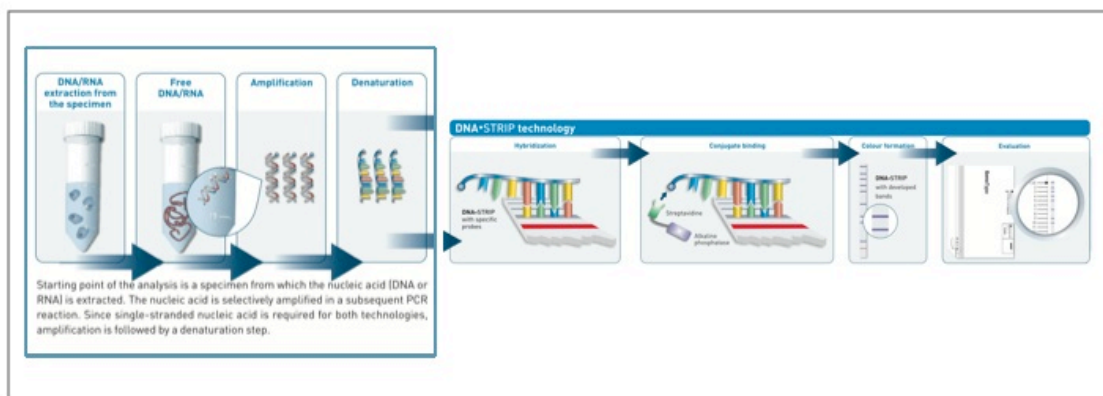


Figura 14. Gráfico de amplificación obtenido mediante un termociclador SmartCycler<sup>®</sup> (Cepheid<sup>®</sup>), al emplear el kit *RealCycler*<sup>®</sup> CMEB (Progenie Molecular, Valencia, España) para detectar CMV y VEB.

La gráfica es el resultado obtenido al amplificar dos controles negativos, un control positivo para el VEB y un control positivo para el CMV. Se observa señal para el control positivo VEB (A7: en naranja) con Ct = 29.37.

#### 4.2.3. Detección de ADN de bacterias periodontopatógenas en muestras de FCG y saliva, mediante PCR convencional

Se empleó el kit microID<sup>®</sup> (Hain Lifescience, GmbH, Nehren, Alemania), basado en la tecnología DNA-STRIP<sup>®</sup>, que permite la detección semicuantitativa de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola*. Para ello, se realizó una PCR múltiple, empleando oligonucleótidos complementarios de la fracción 16s del ADN<sub>r</sub> correspondiente a estos microorganismos, seguida por hibridación reversa simultánea sobre tira de nylon con marcaje colorimétrico (Figura 15).



**Figura 15. Principios del test micro-IDent®.**  
Tomado de: Hain Lifescience, GmbH, Nehren, Alemania

#### 4.2.3.1. Amplificación múltiplex con *primers* marcados con biotina

La amplificación del ADN por PCR se llevó a cabo mediante una reacción con un volumen final de 50 µl, de los cuales 5 µl eran pertenecientes a la muestra y 45 µl a la mezcla de la reacción. Esta última contenía 35 µl de la mezcla *primer* biotinilado - nucleótidos (microIDent®), 5 µl de tampón 10x, 2 µl de 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de agua destilada y 1 µl de Taq polimerasa (ECOTAQ/BIOTAQ, ecogen, Barcelona).

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador TRIO - Thermoblock (Biometra, Göttingen, Alemania). El perfil del ciclo comprendió un primer paso de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, seguidos por 10 ciclos a 95 °C durante 30 segundos y a 58 °C durante 2 minutos; 20 ciclos a 95 °C durante 25 segundos, a 53 °C durante 40 segundos y a 70 °C durante 40 segundos, y un paso final de extensión a 70 °C durante 8 minutos.

#### 4.2.3.2. Hibridación reversa

El procedimiento fue realizado según las instrucciones del fabricante del kit microIDent® (Hain Lifescience, Nehren, Alemania), y se efectuó en las siguientes fases:

1. Los procesos de detección fueron realizados una vez que los reactivos alcanzaron temperatura ambiente. El tampón de hibridación (HYB) y la solución de lavado astringente (SYR) fueron precalentados en un baño a 37 - 49 °C, para disolver los precipitados.

2. Una vez colocadas las cubetas de reacción en su soporte, se mezclaron 20  $\mu$ l de la solución desnaturalizante (DEN) con 20  $\mu$ l del producto amplificado. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
3. Se agitó la solución de hibridación precalentada y se añadió 1 ml a cada cubeta, realizando un leve movimiento longitudinal para la homogeneización de la muestra desnaturalizada con la solución de hibridación.
4. Se rotularon las tiras con lápiz y se colocaron con unas pinzas en la cubeta correspondiente, quedando totalmente sumergidas, con la línea de referencia visible en la parte superior.
5. Se colocó la placa de soporte de las cubetas en un baño a  $45 \pm 0.5$  °C. Se incubaron durante 30 minutos con una intensidad del 10% en la escala de agitación del baño.
6. A continuación, se retiró la placa del baño y se aspiró con una pipeta todo el líquido, dejando lo más secas posible cada una de las tiras.
7. Se agitó la solución de lavado astringente precalentada y se añadió 1 ml a cada cubeta. Se incubó durante 15 minutos en el baño  $45 \pm 0.5$  °C. A partir de este paso, se trabajó a temperatura ambiente.
8. Se preparó la solución del conjugado concentrada 100x (CON-C), diluyendo la misma con el diluyente del conjugado (CON-D), teniendo en cuenta que se empleaba 1 ml por cada tira. El conjugado constaba de fosfatasa alcalina/estreptavidina (la estreptavidina presenta alta afinidad por la biotina, la cual se une a los ácidos nucleicos por una reacción denominada biotinización).
9. Una vez aspirada toda la solución de lavado astringente, se lavó cada tira 1 vez durante 1 minuto con 1 ml de solución de lavado (RIN).
10. Se añadió 1 ml de conjugado diluido a cada tira y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador.
11. Diez minutos antes del final de la incubación, se preparó la solución de sustrato concentrada 100x (SUB-C), diluyendo la misma con el diluyente del

substrato (SUB-D), teniendo en cuenta que se usaran 1 ml por cada tira. Una vez preparada la solución, se conservó protegida de la luz.

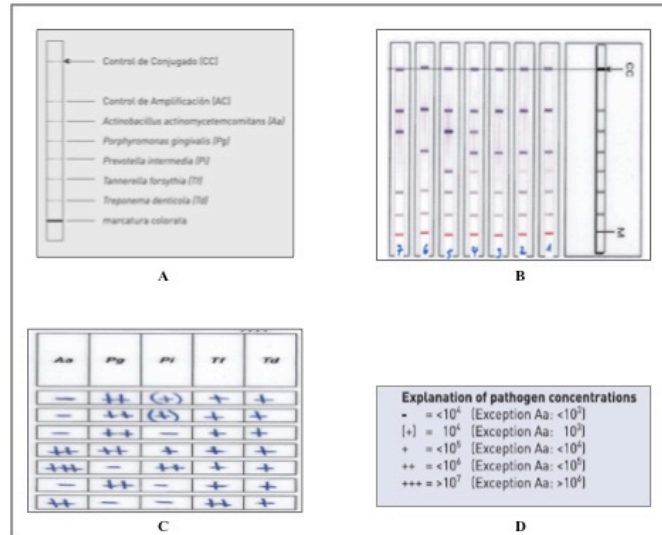
12. Se aspiró la solución de conjugado y se lavó cada tira 2 veces durante 1 minuto con 1 ml de solución de lavado.
13. Se aspiró y se lavó cada tira durante 1 minuto con 1 ml de agua a temperatura ambiente (20 - 25 °C).
14. Se añadió 1 ml de substrato y se incubó entre 3 y 20 minutos a temperatura ambiente (20 - 25 °C).
15. Se aspiró todo el líquido y se lavó 2 veces con 1 ml de agua destilada durante 1 minuto en el agitador orbital.
16. Se retiraron las tiras empleando pinzas y se dejaron secar por completo sobre papel absorbente en una cubeta seca.

#### 4.2.3.3. Interpretación de los resultados

Cada tira suministrada por el fabricante del test microIDent<sup>®</sup>, presenta un total de 7 zonas de reacción: 2 correspondientes al control de calidad (Control de Conjugado (CC) y Control de Amplificación (AC)), y 5 bandas específicas para cada especie bacteriana (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola*) (Figura 16-A).

Los resultados fueron determinados según la intensidad de tinción de cada línea en las bandas específicas, correspondientes a cada bacteria (Figura 16-B). Se representaba mediante cruces el grado de tinción de cada banda (Figura 16-C), siguiendo una escala de menor a mayor: (+), +, ++, +++, que la casa comercial hace corresponder con una concentración específica para cada bacteria (Figura 16-D). La ausencia de tinción se consideró como resultado negativo, lo cual indicaba que la muestra contenía menos que el nivel detectable de ácido nucleico para el microorganismo diana.

El límite de detección estaba determinado por el fabricante y correspondía a  $10^3$  genomas, en el caso de *A. actinomycetemcomitans*, y de  $10^4$  genomas para *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola*.



**Figura 16. Interpretación de resultados según el fabricante del kit microIDent® (Hain Lifescience, Nehren, Alemania).**

#### 4.2.3.4. Control de calidad

- Control de Conjugado (CC): debía aparecer una línea en esta zona, documentando la eficacia del conjugado unido y la reacción del sustrato.
- Control de Amplificación (AC): si el test estaba realizado correctamente, el amplicón generado durante la amplificación se uniría a esta zona. Si no aparecía la banda, indicaría errores durante los pasos de amplificación o en el transporte de inhibidores de amplificación con el ADN aislado; en este caso, los resultados del test no eran válidos y se eliminaban.

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significación estadística se estableció al 95% de intervalo de confianza (error  $\alpha=0.05$ ) y la unidad de análisis seleccionada fue el sujeto. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa SPSS®, versión 22.0 para Windows.

Para evaluar la bondad de ajuste a la normalidad de las diferentes variables objeto de estudio, se empleó el test Kolmogorov-Smirnov. En los dos grupos (periodontitis crónica y control) las medidas estaban cercanas al umbral de significatividad ( $p<0.05$ ), por lo que en la comparación de los grupos se muestran tanto el  $p$ -valor del test

*t*-Student (procedimiento T-TEST) así como del test no paramétrico U de Mann-Whitney (procedimiento NPAR TEST).

Las variables sociodemográficas y las características clínicas de ambos grupos se evaluaron mediante el test *t*-Student y la prueba de U de Mann-Whitney. La variable sexo fue analizada mediante el test de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). Los datos se expresaron como media y desviación estándar (DE).

Para comparar la frecuencia de detección (presencia o ausencia) de CMV y VEB entre ambos grupos, tanto en muestra de FCG y en saliva, se construyeron tablas de contingencia 2x2, con la obtención de las frecuencias y porcentajes correspondientes. Se aplicó la prueba de  $\chi^2$  para contrastar la independencia o influencia entre las variables cualitativas, con información en cada casilla de la tabla de contingencia del porcentaje en fila y los residuos corregidos no tipificados, para ayudar a descubrir las tramas en los datos que contribuyen a una influencia significativa.

Respecto al análisis de las bacterias periodontopatógenas entre ambos grupos, se calcularon igualmente tablas de contingencia 2x2, teniendo en cuenta las diferentes categorías que establece el test microIDent<sup>®</sup>, obteniendo la frecuencia y porcentajes de las categorías. Para analizar posibles diferencias intergrupo, en función de la presencia (pacientes positivos) o ausencia (pacientes negativos) de los diferentes patógenos periodontales, se empleó el test de  $\chi^2$ , tanto en muestra de FCG y saliva.

La relación entre especies víricas y bacterianas se analizó confeccionando tablas de contingencia 2x2, aplicando el test de  $\chi^2$ . Se calculó la odds ratio (OR, tasa de probabilidad) en el caso en el que dos especies mostraran una asociación estadísticamente significativa.

Para valorar la relación entre parámetros clínicos y microorganismos (virus y bacterias), se aplicó el test *t*-Student y el test de Mann-Whitney.

Con el objetivo de identificar variables predictoras que puedan explicar la presencia de VEB en FCG y en saliva, se analizó la influencia de las diferentes variables analizadas en este estudio mediante un análisis multivariante. Se realizó un análisis de segmentación, aplicando el test CHAID exhaustivo (*Chi-Square automatic interaction detector*), dado que ofrece la capacidad de combinar variables categóricas y continuas.

Se trata de un test no paramétrico, basado en algoritmos, que clasifica las variables independientes en variables predictoras de una variable dependiente. Se realiza para segmentar, estratificar, predecir e identificar interacciones entre las variables de la muestra.

La presencia de VEB en FCG y en saliva se estableció como la variable dependiente, mientras que las variables independientes evaluadas fueron: 1) clínicas (índice de placa, profundidad de sondaje, nivel de inserción clínico y sangrado al sondaje) y 2) microbiológicas (frecuencia de detección de los siguientes patógenos: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola*). La significación del análisis de segmentación se realizó empleando el test  $\chi^2$ .

Los resultados del análisis CHAID exhaustivo se representaron en árboles de decisiones (procedimiento TREE), los cuales ilustran reglas de decisión. Parten de un nodo raíz que contiene todas las observaciones de la muestra. A medida que se desplaza por el árbol, los datos se ramifican en subconjuntos de datos que se excluyen mutuamente.

Finalmente, para comparar la toma de muestra en FCG con la saliva, para la detección de CMV, VEB y bacterias periodontopatógenas, se confeccionaron tablas de contingencia de 2x2, a fin de determinar, entre otros parámetros, la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo. Se calcularon los valores del test  $\chi^2$  y el estadístico kappa para medir el acuerdo entre ambos métodos diagnósticos. Un valor de kappa igual a 1 indicaba un acuerdo perfecto. Un valor igual a 0 indicaba que el acuerdo no era mejor que el que se obtendría por azar. Entre 0 a 0.2 se consideraba muy bajo, de 0.2 a 0.4 bajo, de 0.4 a 0.6 moderado, entre 0.6 a 0.8 alto y de 0.8 a 1 muy alto (Landis y Koch, 1977).

## **VI. RESULTADOS**

---





## 1. CARACTERÍSTICAS POBLACIONALES

Participaron 48 sujetos en el estudio, 24 formando parte del grupo periodontitis crónica y 24 en el grupo control.

### *Grupo periodontitis crónica*

La media de edad de los integrantes de este grupo fue de 51.25 años (DE 9.83), con rangos entre los 28 y 69 años. 9 pacientes eran hombres (37.5%) y 15 mujeres (62.5%).

### *Grupo control*

El rango de edades de los sujetos de este grupo oscilaba entre los 27 y 69 años, con un promedio de 40.88 años (DE 8.68). 12 pacientes eran hombres (50%) y 12 mujeres (50 %).

La distribución de los pacientes, en cuanto a edad y sexo, se muestra en la Tabla 9.

**TABLA 9. Descripción demográfica de la población de estudio**

		PERIODONTITIS CRÓNICA	CONTROL	<i>p</i> -valor <i>t</i> -Student	<i>p</i> -valor Mann-Whitney	<i>p</i> -valor $\chi^2$
<b>Edad</b>	Media	51.25	40.88	< 0.001	< 0.001	n/a
	DE	9.830	8.68			
	Rango	28-69	27-69			
<b>Sexo</b>	Hombre (%)	9 (37.5 %)	12 (50 %)	n/a	n/a	0.383
	Mujer (%)	15 (62.5 %)	12 (50 %)			

DE: desviación estándar; n/a: no aplicable.

Los resultados del análisis demográfico mostraron que existían diferencias estadísticamente significativas al 95% en relación a la edad, en *t*-Student ( $p < 0.001$ ) y en Mann-Whitney ( $p < 0.001$ ), entre el grupo periodontitis crónica (51.25 años de media) y el grupo control sano (40.88 años de media). Sin embargo, en cuanto a sexo, no se observó diferencia estadísticamente significativa al 95%, según el test  $\chi^2$  ( $p = 0.383$ ).

## 2. VARIABLES CLÍNICAS

### 2.1. Características clínicas de los grupos de estudio

El grupo periodontitis crónica presentaba una media de 25.33 dientes (DE 2.61) y el grupo control de 27.50 (DE 0.88). La presencia media de placa era del 66.84% (DE 16.37) en el grupo periodontitis crónica y del 10.39% (DE 4.82) en el grupo control. La media de profundidad de sondaje fue de 3.54 mm (DE 0.56) en el grupo periodontitis crónica y 1.90 mm (DE 0.17) en el grupo control. El nivel de inserción clínico medio fue de 4.08 mm (DE 0.88) en el grupo periodontitis crónica y de 1.95 (DE 0.17) en el grupo control. El porcentaje de sangrado al sondaje fue del 41.40% (DE 14.95) en el grupo periodontitis crónica y en el grupo control de 3.62% (DE 2.45).

El resumen de las variables clínicas registradas se muestra en la Tabla 10:

**Tabla 10. Características clínicas de los grupos de estudio**

	<b>PERIODONTITIS CRÓNICA Media (DE)</b>	<b>CONTROL Media (DE)</b>	<b><i>p</i>-valor <i>t</i>-Student</b>	<b><i>p</i>-valor Mann- Whitney</b>
<b>Número dientes</b>	25.33 (2.61)	27.50 (0.88)	0.001	< 0.001
<b>IP (%)</b>	66.84 (16.37)	10.39 (4.82)	<0.001	< 0.001
<b>PS (mm)</b>	3.54 (0.56)	1.90 (0.17)	< 0.001	< 0.001
<b>NIC (mm)</b>	4.08 (0.88)	1.95 (0.17)	< 0.001	< 0.001
<b>BOP (%)</b>	41.40 (14.95)	3.62 (2.45)	< 0.001	< 0.001

IP: índice de placa; PS: profundidad de sondaje; NIC: nivel de inserción clínico; BOP: sangrado al sondaje;  
DE: desviación estándar

En relación al número de dientes, se observaron diferencias estadísticamente significativas al 95% en *t*-Student ( $p=0.001$ ) y en Mann-Whitney ( $p<0.001$ ), entre el grupo periodontitis crónica (25.33 dientes de media) y el grupo control (27.50 dientes de media).

Respecto al índice de placa, existían diferencias estadísticamente significativas al 95% en *t*-Student ( $p<0.001$ ) y en Mann-Whitney ( $p<0.001$ ), entre el grupo periodontitis crónica y el grupo control (66.84% y 10.39% de media, respectivamente).

En profundidad de sondaje, se encontraron diferencias estadísticamente significativas al 95% en *t*-Student ( $p < 0.001$ ) y en Mann-Whitney ( $p < 0.001$ ), entre el grupo periodontitis crónica (3.54 mm de media) y el grupo control (1.90 mm de media).

En nivel clínico de inserción, existían diferencias estadísticamente significativas al 95% en *t*-Student ( $p < 0.001$ ) y en Mann-Whitney ( $p < 0.001$ ), entre el grupo periodontitis crónica y el grupo control (4.08 y 1.95 mm de media, respectivamente).

Respecto al sangrado al sondaje, también se observaron diferencias estadísticamente significativas al 95% en *t*-Student ( $p < 0.001$ ) y en Mann-Whitney ( $p < 0.001$ ), entre el grupo periodontitis crónica (41.40% de media) y el grupo control (3.62% de media).

## 2.2. Características clínicas de las localizaciones

Las características clínicas de las localizaciones donde se tomaron las muestras de FCG se muestran en la Tabla 11.

El índice de placa era del 98% (DE 0.10) en el grupo periodontitis crónica y del 0.02% (DE 0.07) en el grupo control. La media de profundidad de sondaje fue de 5.93 mm (DE 1.07) en el grupo periodontitis crónica y de 2.32 mm (DE 0.57) en el grupo control. La recesión media fue de 0.45 mm (DE 0.72) en el grupo periodontitis crónica y de 0.00 mm (DE 0.00) en el grupo control. El porcentaje de sangrado al sondaje fue del 91% (DE 0.17) en el grupo periodontitis crónica y de 0.02% (DE 0.07) en el grupo control.

**Tabla 11. Características clínicas de las localizaciones seleccionadas (FCG)**

	<b>PERIODONTITIS CRÓNICA Media (DE)</b>	<b>CONTROL Media (DE)</b>	<b><i>p</i>-valor <i>t</i>-Student</b>	<b><i>p</i>-valor Mann- Whitney</b>
<b>IP (%)</b>	98 (0.10)	0.02 (0.07)	< 0.001	< 0.001
<b>PS (mm)</b>	5.93 (1.07)	2.32 (0.57)	< 0.001	< 0.001
<b>REC (mm)</b>	0.45 (0.72)	0.00 (0.00)	0.006	< 0.001
<b>BOP (%)</b>	91 (0.17)	0.02 (0.07)	< 0.001	< 0.001

IP: índice de placa; PS: profundidad de sondaje; REC: recesión; BOP: sangrado al sondaje;  
DE: desviación estándar

Se observaron diferencias estadísticamente significativas al 95% en *t*-Student ( $p < 0.001$ ) y en Mann-Whitney ( $p < 0.001$ ) en el índice de placa de las localizaciones seleccionadas para la toma de muestras de FCG, entre el grupo periodontitis crónica (98% de media) y el grupo control (0.02% de media).

En relación a la profundidad de sondaje, existían diferencias estadísticamente significativas al 95% en *t*-Student ( $p < 0.001$ ) y en Mann-Whitney ( $p < 0.001$ ), entre el grupo periodontitis crónica (5.93 mm de media) y el grupo control (2.32 mm de media).

Respecto a la recesión, las diferencias fueron estadísticamente significativas al 95% en *t*-Student ( $p = 0.006$ ) y en Mann-Whitney ( $p < 0.001$ ), entre el grupo periodontitis crónica y el grupo control (0.45 mm de media y 0 mm de media, respectivamente).

En porcentaje de sangrado al sondaje, se encontraron diferencias estadísticamente significativas al 95% en *t*-Student ( $p < 0.001$ ) y en Mann-Whitney ( $p < 0.001$ ), entre el grupo periodontitis crónica (91% de media) y el grupo control (0.02% de media).

### **3. DETECCIÓN DE ADN DE CMV Y VEB, EN MUESTRAS DE FCG Y SALIVA, MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL**

#### **3.1. Detección de ADN de CMV y VEB en muestras de FCG**

En relación a la detección de ADN de CMV en muestras de FCG, no se halló en ningún sujeto del grupo periodontitis crónica ni del grupo control.

Respecto al VEB, no se halló ADN en ninguna muestra de FCG del grupo periodontitis crónica. En el grupo control, solo se detectó en 1 individuo (4.2%). Según el test  $\chi^2$ , las diferencias entre ambos grupos no eran estadísticamente significativas al 95% ( $p = 0.312$ ) (Tabla 12).

**Tabla 12. Tabla cruzada 2x2: Frecuencia de detección de ADN de VEB en FCG**

Grupo		VEB en FCG		Total
		Test +	Test -	
Periodontitis crónica	n	0	24	24
	% dentro de grupo	0%	100%	100%
	Residuo corregido	1	-1	
Control	n	1	23	24
	% dentro de grupo	4.2%	95.8%	100%
	Residuo corregido	-1	1	
Total	n	1	47	48
	% dentro de grupo	2.1%	97.9%	100%

### 3.2. Detección de ADN de CMV y VEB en muestras de saliva

En saliva, no se halló ADN de CMV en ningún individuo del grupo periodontitis crónica ni del grupo control.

En 3 sujetos del grupo periodontitis crónica se detectó ADN de VEB en saliva (12.5%) y en el grupo control en 5 individuos (20.8%). En el sujeto en el que se detectó ADN de VEB en FCG, también se detectó en saliva (datos no mostrados). Según el test  $\chi^2$ , no hubo diferencias estadísticamente significativas al 95% ( $p=0.439$ ) entre ambos grupos (Tabla 13).

**Tabla 13. Tabla de contingencia 2x2. Frecuencia de detección de VEB en saliva**

Grupo		VEB en saliva		Total
		Test +	Test -	
Periodontitis crónica	n	3	21	24
	% dentro de grupo	12.5%	87.5%	100%
	Residuo corregido	8	-8	
Control	n	5	19	24
	% dentro de grupo	20.8%	79.2%	100%
		-8	8	
Total	n	8	40	48
	% dentro de grupo	16.7%	83.3%	100%

### 3.3. Concordancia entre la muestra de FCG y saliva para la detección de CMV y VEB

Al no detectarse ADN de CMV en ninguna muestra de FCG ni de saliva, no se realizó ningún cálculo.

En relación al VEB, de los 47 pacientes negativos en muestra de FCG (97.9%), 40 también lo fueron en saliva (83.3%), apareciendo por tanto, 7 falsos positivos. Solo 1 sujeto fue positivo para VEB en muestra de FCG, a diferencia de 8 que se detectaron en saliva. No hubo concordancia estadísticamente significativa entre ambos métodos de toma de muestras, según  $\chi^2$  ( $p=0.24$ ), siendo el grado de concordancia muy bajo ( $\kappa=0.192$ ) (Tabla 14).

La sensibilidad de la saliva, tomando como referencia estándar la muestra en FCG para detectar VEB, fue de 100% y la especificidad del 85%. El valor predictivo positivo y negativo fueron del 13% y 100%, respectivamente.

Sin embargo, cuando la saliva se tomó como referencia, la muestra en FCG mostró una sensibilidad del 13%, una especificidad del 100% y un valor predictivo positivo y negativo del 100% y del 85%, respectivamente.

**Tabla 14. Tabla de contingencia 2x2, relacionando frecuencia de detección de VEB en FCG y saliva**

			VEB en FCG		Total
			Test +	Test -	
VEB saliva	Test +	n	1	7	8
		% del total	2.1%	14.6%	16.7%
	Test -	n	0	40	40
		% del total	0%	83.3%	83.3%
Total		n	1	47	40
		% del total	2.1%	97.9%	100%

## 4. DETECCIÓN DE BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS EN MUESTRAS DE FCG Y SALIVA, MEDIANTE PCR CONVENCIONAL

### 4.1. Detección de bacterias periodontopatógenas en muestras de FCG

#### *Frecuencia de detección de patógenos periodontales*

En la Tabla 15 se muestra la frecuencia de detección de los patógenos periodontales evaluados en FCG (número absoluto respecto al total de pacientes pertenecientes al grupo periodontitis crónica y al grupo control, respectivamente, y porcentaje).

En el grupo periodontitis crónica, los patógenos hallados con mayor frecuencia fueron *P. gingivalis* (91.7%) y *T. forsythia* (91.7%), seguidos en orden decreciente por *T. denticola* (79.2%), *P. intermedia* (70.8%) y *A. actinomycetemcomitans* (12.5%). En el grupo control, el patógeno más frecuentemente detectado fue *T. forsythia* (37.5%), seguido de *P. gingivalis* (12.5%). La frecuencia de detección para *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* y *T. denticola* para este grupo fue de 4.2%.

**Tabla 15. Frecuencia de detección de patógenos periodontales en muestra de FCG**

Especie bacteriana FCG	Periodontitis crónica n (%)	Control n (%)	p-valor $\chi^2$
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	3 (12.5%)	1 (4.2%)	0.296
<i>P. gingivalis</i>	22 (91.7 %)	3 (12.5%)	< 0.001
<i>P. intermedia</i>	17 (70.8%)	1 (4.2%)	< 0.001
<i>T. forsythia</i>	22 (91.7%)	9 (37.5%)	< 0.001
<i>T. denticola</i>	19 (79.2%)	1 (4.2%)	< 0.001

Respecto a *A. actinomycetemcomitans*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas al 95% ( $p=0.296$ ), según el test  $\chi^2$ , entre el grupo periodontitis crónica (12.5%) y el grupo control (4.2%).

Para *P. gingivalis*, las diferencias entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas al 95% ( $p<0.001$ ), según el test  $\chi^2$ . En el grupo periodontitis crónica se halló en un mayor porcentaje de pacientes (91.7%) que en el grupo control (12.5%).



Las diferencias en frecuencia de detección de *P. intermedia* fueron estadísticamente significativas al 95% ( $p < 0.001$ ), según el test  $\chi^2$ . En el grupo periodontitis crónica se detectó en el 70.8% de los sujetos. Sin embargo, en el grupo control la frecuencia de detección fue muy baja (4.2%).

En relación a *T. forsythia*, se observaron diferencias estadísticamente significativas al 95% ( $p < 0.001$ ), según el test  $\chi^2$ , entre ambos grupos. En el grupo periodontitis crónica se halló en un alto porcentaje de pacientes (91.7%). En el grupo control se detectó en el 12.5% de los individuos.

Para *T. denticola*, también se encontraron diferencias estadísticamente significativas al 95% ( $p < 0.001$ ), según el test  $\chi^2$ . En el grupo periodontitis crónica se detectó en un 79.2% de los pacientes y solo en el 4.2% de los sujetos del grupo control.

### ***Proporción y distribución de frecuencias de detección de patógenos periodontales***

#### ***A. actinomycetemcomitans***

En el grupo periodontitis crónica, se detectó *A. actinomycetemcomitans* en FCG en tres pacientes, con un umbral  $>10^6$  (12.5% respecto a un 6.3% esperado) y solo en 1 paciente del grupo control, con un umbral de detección  $<10^5$  (4.2% respecto a un 2.1% esperado). No se detectó en el 87.5% de los pacientes del grupo periodontitis crónica y en el 95.8% del grupo control. Según el test  $\chi^2$ , las diferencias en distribución de frecuencias de detección de este patógeno, entre ambos grupos, no eran estadísticamente significativas al 95% ( $p = 0.129$ ) (Tabla 16).

**Tabla 16. Tabla cruzada con la distribución de frecuencias de detección (%) de *A. actinomycetemcomitans* en muestras de FCG**

Grupo		<i>A. actinomycetemcomitans</i> en FCG			Total
		$<10^3$	$<10^5$	$>10^6$	
Periodontitis crónica	n	21	0	3	24
	% dentro de grupo	87.5%	0%	12.5%	100%
	Residuo corregido	-1	-1	1.8	
Control	n	23	1	0	24
	% dentro de grupo	95.8%	4.2%	0 %	100%
	Residuo corregido	1	1	-1.8	
Total	n	44	1	3	48
	% dentro de grupo	91.7%	2.1%	6.3%	100%

*P. gingivalis*

Las diferencias en distribución de frecuencias de detección de *P. gingivalis* en FCG entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas al 95% ( $p < 0.001$ ), según el test  $\chi^2$  (Tabla 17). En el grupo periodontitis crónica, en un bajo porcentaje de pacientes no se detectó ( $<10^4$ ) *P. gingivalis* (8.3% respecto a un 47.9% esperado) y en un alto porcentaje se halló con un umbral  $>10^7$  (79.2% respecto a un 39.6% esperado)

En el grupo control, no se halló en el 87.5% de los sujetos (respecto a un 47.9% esperado) y no se detectó en ningún individuo con un umbral  $>10^7$  (0% respecto a un 39.6% esperado).

**Tabla 17. Tabla cruzada con la distribución de frecuencias de detección (%) de *P. gingivalis* en muestras de FCG**

Grupo		<i>P. gingivalis</i> en FCG				Total
		$<10^4$	$<10^5$	$>10^6$	$>10^7$	
Periodontitis crónica	n	2	1	2	19	24
	% dentro de grupo	8.3%	4.2%	8.3%	79.2%	100%
	Residuo corregido	-5.5	0	0	5.6	
Control	n	21	1	2	0	24
	% dentro de grupo	87.5%	4.2%	8.3%	0%	100%
	Residuo corregido	5.5	0	0	-5.6	
Total	n	23	2	4	19	48
	% dentro de grupo	47.9%	4.2%	8.3%	39.6%	100%

*P. intermedia*

Se observaron diferencias estadísticamente significativas al 95% ( $p < 0.001$ ) entre ambos grupos, en distribución de frecuencias de detección de *P. intermedia* en FCG, según el test  $\chi^2$  (Tabla 18). En el grupo periodontitis crónica había un menor porcentaje de pacientes en los que se detectaba con un umbral de detección  $<10^4$  (29.2% respecto a un 62.5% esperado) y un mayor porcentaje en los que se hallaba con un umbral  $<10^5$  (33.3% respecto a un 18.8% esperado) y con un umbral  $>10^7$  (20.8% respecto a un 10.4% esperado).

Sin embargo, en un alto porcentaje de pacientes del grupo control dicho patógeno no se detectaba o estaba por debajo del umbral de detección (95.8% respecto a un 62.5% esperado). Solo se detectó *P. intermedia* en 1 paciente (4.2%) del grupo control, con un umbral  $<10^5$  (4.2% respecto a un 18.8% esperado) y ninguno con un umbral de detección  $>10^7$  (0% respecto a un 10.4% esperado).

**Tabla 18. Tabla cruzada con la distribución de frecuencias de detección (%) de *P. intermedia* en muestras de FCG**

Grupo		<i>P. intermedia</i> en FCG					Total
		$<10^4$	$10^4$	$<10^5$	$>10^6$	$>10^7$	
Periodontitis crónica	n	7	2	8	2	5	24
	% dentro de grupo	29.2%	8.3%	33.3%	8.3%	20.8%	100%
	Residuo corregido	-4.8	1.4	2.6	1.4	2.4	
Control	n	23	0	1	0	0	24
	% dentro de grupo	95.8%	0%	4.2%	0%	0%	100%
	Residuo corregido	4.8	-1.4	-2.6	-1.4	-2.4	
Total	n	30	2	9	2	5	48
	% dentro de grupo	62.5%	4.2%	18.8%	4.2%	10.4%	100%

### *T. forsythia*

Las diferencias, en distribución de frecuencias de detección de *T. forsythia* en FCG, fueron estadísticamente significativas al 95% ( $p < 0.001$ ) entre el grupo periodontitis crónica y el grupo, según el test  $\chi^2$  (Tabla 19).

En un bajo porcentaje de pacientes del grupo periodontitis crónica no se detectaba dicha bacteria (29.2% respecto a un 62.5% esperado), mientras que en un gran porcentaje se detectaba con un umbral  $>10^7$  (79.2% respecto a un 39.6% esperado).

En el grupo control, no se halló en el 62.5% de los sujetos (respecto a un 35.4% esperado) o estaba por debajo del umbral de detección. En ningún individuo del grupo control se detectó *T. forsythia* con un umbral  $>10^7$  (0% respecto a un 39.6% esperado).

**Tabla 19. Tabla cruzada con la distribución de frecuencias de detección (%) de *T. forsythia* en muestras de FCG**

Grupo		<i>T. forsythia</i> en FCG					Total
		<10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	<10 <sup>5</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>7</sup>	
Periodontitis crónica	n	2	0	0	3	19	24
	% dentro de grupo	8.3%	0%	0%	12.5%	79.2%	100%
	Residuo corregido	-3.9	-2.4	-2.1	1.8	5.6	
Control	n	15	5	4	0	0	24
	% dentro de grupo	62.5%	20.8%	16.7%	0%	0%	100%
	Residuo corregido	3.9	2.4	2.1	-1.8	-5.6	
Total	n	17	5	4	3	19	48
	% dentro de grupo	35.4%	10.4%	8.3%	6.3%	39.6%	100%

### *T. denticola*

Se observaron diferencias estadísticamente significativas al 95% ( $p < 0.001$ ), según el test  $\chi^2$ , entre el grupo periodontitis crónica y el grupo control en la distribución de frecuencias de detección de *T. denticola* en FCG (Tabla 20).

En el grupo periodontitis crónica, en el 20.8% de los pacientes no se halló *T. denticola* (respecto al 58.3 % esperado). En un 37.5% (respecto al 18.8% esperado) se detectó con un nivel de detección  $>10^6$  y en un 20.8% de los sujetos con periodontitis crónica (respecto a un 10.4% esperado) se detectó con un umbral de detección  $>10^7$ .

En un alto porcentaje de los sujetos del grupo control no se detectó *T. denticola* (95.8% respecto al 58.3% esperado) y solo se detectó en 1 paciente (4.2% respecto a un 2.1% esperado) con un umbral de  $10^4$ .

**Tabla 20. Tabla cruzada con la distribución de frecuencias de detección (%) de *T. denticola* en muestras de FCG**

Grupo		<i>T. denticola</i> en FCG					Total
		<10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	<10 <sup>5</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>7</sup>	
Periodontitis crónica	n	5	0	5	9	5	24
	% dentro de grupo	20.8%	0%	20.8%	37.5%	20.8%	100%
	Residuo corregido	-5.3	-1	2.4	3.3	2.4	
Control	n	23	1	0	0	0	24
	% dentro de grupo	95.8%	4.2%	0%	0%	0%	100%
	Residuo corregido	5.3	1	-2.4	-3.3	-2.4	
Total	n	28	1	5	9	5	48
	% dentro de grupo	58.3%	2.1%	10.4%	18.8%	10.4%	100%

#### 4.2. Detección de bacterias periodontopatógenas en muestras de saliva

##### *Frecuencia de detección de patógenos periodontales en saliva*

En la Tabla 21 se muestra la frecuencia de detección de los patógenos evaluados (número absoluto respecto al total de pacientes pertenecientes al grupo periodontitis crónica y al grupo control, respectivamente, y porcentaje) en las muestras de saliva.

En el grupo periodontitis crónica, el patógeno hallado con mayor frecuencia fue *T. denticola* (83.3%), seguido en orden decreciente por *P. gingivalis* (79.2%), *T. forsythia* (79.2%), *A. actinomycetemcomitans* (16.7 %) y *P. intermedia* (12.5%). En el grupo control, el patógeno más frecuentemente detectado fue *T. forsythia* (70.8 %), seguido de *T. denticola* (45.8%). La frecuencia de detección para *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* fue del 8.3 %, y para *P. intermedia* del 4.2%.

**Tabla 21. Frecuencia de detección de patógenos periodontales en saliva**

Especie bacteriana SALIVA	Periodontitis crónica n (%)	Control n (%)	p-valor $\chi^2$
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	4 (16.7%)	2 (8.3%)	0.383
<i>P. gingivalis</i>	19 (79.2%)	2 (8.3%)	< 0.001
<i>P. intermedia</i>	3 (12.5%)	1 (4.2%)	0.296
<i>T. forsythia</i>	19 (79.2%)	17 (70.8 %)	0.505
<i>T. denticola</i>	20 (83.3%)	11 (45.8%)	0.007

Respecto a la frecuencia de detección de *A. actinomycetemcomitans* en saliva, las diferencias entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas al 95% ( $p=0.383$ ), según el test  $\chi^2$ .

Para *P. gingivalis*, se observaron diferencias estadísticamente significativas al 95% ( $p<0.001$ ), según el test  $\chi^2$ . En el grupo periodontitis crónica se halló en un alto porcentaje de los sujetos (79.2% respecto a un 43.8% esperado). En el grupo control, se detectó en un 8.3% de los sujetos (respecto a un 43.8% esperado).

En cuanto a *P. intermedia*, las diferencias no fueron estadísticamente significativas al 95% ( $p=0.296$ ), según el test  $\chi^2$ . En el grupo periodontitis crónica se halló en un bajo porcentaje de los sujetos (12.5% respecto a un 8.3% esperado). En el grupo control se detectó en un 4.2% de los individuos (respecto a un 8.3% esperado).

En relación a *T. forsythia*, según el test  $\chi^2$ , las diferencias entre el grupo periodontitis crónica y el grupo control no eran estadísticamente significativas al 95% ( $p=0.505$ ). En ambos grupos se halló en un alto porcentaje de los sujetos: en el grupo periodontitis crónica en el 79.2% (respecto a un 75% esperado) y en grupo control en un 70.8% (respecto a un 75% esperado).

Para *T. denticola* las diferencias fueron estadísticamente significativas al 95% ( $p=0.007$ ), según el test  $\chi^2$ . En el grupo periodontitis crónica se detectó en un alto porcentaje de individuos (83.3% respecto a un 35.4% esperado) y en el grupo control en un 45.8% (respecto a un 64.6% esperado).

### ***Proporción y distribución de frecuencias de detección de patógenos periodontales***

#### ***A. actinomycetemcomitans***

Las diferencias entre el grupo periodontitis crónica y el grupo control, en distribución de frecuencias de detección de *A. actinomycetemcomitans* en saliva, no fueron estadísticamente significativas al 95% ( $p=0.699$ ), según el test  $\chi^2$ . No se detectó en el 83.3% (respecto a un 87.5% esperado) de los pacientes del grupo periodontitis crónica y en el 91.7% (respecto a un 87.5% esperado) de los sujetos del grupo control. No se halló en ningún sujeto de ambos grupos con niveles  $>10^6$  o  $>10^7$  (Tabla 22).

**Tabla 22. Tabla cruzada con la distribución de frecuencias de detección (%) de *A. actinomycetemcomitans* en saliva**

Grupo		<i>A. actinomycetemcomitans</i> en saliva				Total
		<10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	<10 <sup>4</sup>	<10 <sup>5</sup>	
Periodontitis crónica	n	20	2	1	1	24
	% dentro de grupo	83.3%	8.3%	4.2%	4.2 %	100%
	Residuo corregido	-9	6	1	0	
Control	n	22	1	0	1	24
	% dentro de grupo	91.7%	4.2%	0%	4.2%	100%
	Residuo corregido	9	-6	-1	0	
Total	n	42	3	1	2	48
	% dentro de grupo	87.5%	6.3%	2.1%	4.2%	100%

### *P. gingivalis*

Las diferencias en distribución de frecuencias de detección de *P. gingivalis* en saliva, entre el grupo periodontitis crónica y el grupo control, fueron estadísticamente significativas al 95% ( $p < 0.001$ ), según el test  $\chi^2$ .

En el grupo periodontitis crónica no se detectó en un 20.8% de sujetos (respecto a un 56.3% esperado) y en un 16.7% (respecto a un 8.3% esperado) se halló con un umbral  $>10^7$ .

En el grupo control, en un alto porcentaje de individuos no se detectó *P. gingivalis* en saliva, (91.7% respecto a un 56.3% esperado). En 1 sujeto de este grupo pudo detectarse con un umbral  $>10^6$  (4.2% respecto a un 14.6% esperado) y en ningún paciente del grupo control se halló con un umbral  $>10^7$  (0% respecto a un 8.3% esperado) (Tabla 23).

**Tabla 23. Tabla cruzada con la distribución de frecuencias de detección (%) de *P. gingivalis* en saliva**

Grupo		<i>P. gingivalis</i> en saliva					Total
		<10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	<10 <sup>5</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>7</sup>	
Periodontitis crónica	N	5	5	4	6	4	24
	% dentro de grupo	20.8%	20.8%	16.7%	25%	16.7%	100%
	Residuo corregido	-4.9	1.7	2.1	2	2.1	
Control	N	22	1	0	1	0	24
	% dentro de grupo	91.7%	4.2%	0%	4.2%	0%	100%
	Residuo corregido	4.9	-1.7	-2.1	-2	-2.1	
Total	N	27	6	4	7	4	48
	% dentro de grupo	56.3%	12.5%	8.3%	14.6%	8.3%	100%

### *P. intermedia*

No se observaron diferencias estadísticamente significativas al 95% ( $p=0.491$ ) entre el grupo periodontitis crónica y el grupo control en distribución de frecuencias de detección de *P. intermedia* en saliva, según el test  $\chi^2$ . Tanto en el grupo periodontitis crónica y en el grupo control, había un alto porcentaje de pacientes en los que no se detectaba dicha bacteria (87.5% y 91.7%, respectivamente). En ningún paciente de ambos grupos se detectó con umbrales  $>10^6$  o  $>10^7$  (Tabla 24).

**Tabla 24. Tabla cruzada con la distribución de frecuencias de detección (%) de *P. intermedia* en saliva**

Grupo		<i>P. intermedia</i> en saliva			Total
		<10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	<10 <sup>5</sup>	
Periodontitis crónica	n	21	1	2	24
	% dentro de grupo	87.5%	4.2%	8.3%	100 %
	Residuo corregido	-1	1	6	
Control	n	23	0	1	24
	% dentro de grupo	95.8%	0%	4.2%	100%
	Residuo corregido	1	-1	-6	
Total	n	44	1	3	48
	% dentro de grupo	91.7%	2.1%	6.3%	100%



*T. forsythia*

Las diferencias fueron estadísticamente significativas al 95% ( $p=0.029$ ) entre el grupo periodontitis crónica y el grupo control, en relación a la distribución de frecuencias de detección de *T. forsythia* en saliva, según el test  $\chi^2$  (Tabla 25).

En el grupo periodontitis crónica, en un 45.8% de sujetos se detectó con un umbral  $>10^6$  y en un 25% con un umbral de detección  $>10^7$ . No se detectó en el 20.8% de los pacientes del grupo periodontitis crónica. Sin embargo, en el grupo control, no se halló en el 29.2% de los sujetos, y solo en el 4.2% se detectó con un umbral  $>10^7$ .

**Tabla 25. Tabla cruzada con la distribución de frecuencias de detección (%) de *T. forsythia* en saliva**

Grupo		<i>T. forsythia</i> en saliva					Total
		$<10^4$	$10^4$	$<10^5$	$>10^6$	$>10^7$	
Periodontitis crónica	n	5	0	2	11	6	24
	% dentro de grupo	20.8%	0 %	8.3%	45.8%	25%	100%
	Residuo corregido	-7	-1	-2.4	1.5	2	
Control	n	7	1	9	6	1	24
	% dentro de grupo	29.2%	4.2%	37.5%	25%	4.2%	100%
	Residuo corregido	7	1	2.4	-1.5	-2	
Total	n	12	1	11	17	7	48
	% dentro de grupo	25%	2.1%	22.9%	35.4%	14.6%	100%

*T. denticola*

Las diferencias en distribución de frecuencias de detección de *T. denticola* en saliva fueron estadísticamente significativas al 95% ( $p=0.001$ ) entre el grupo periodontitis crónica y el grupo control, según el test  $\chi^2$  (Tabla 26).

En el grupo periodontitis crónica, había un menor porcentaje de sujetos en los que no se detectaba dicha bacteria (16.7% respecto a un 35.4% esperado) en relación al grupo control (54.2% respecto a un 35.4% esperado). Con un umbral de  $>10^7$ , solo se halló en un 8.3% (respecto a un 4.2% esperado) de los sujetos del grupo periodontitis crónica y en ningún paciente del grupo control

**Tabla 26. Tabla cruzada con la distribución de frecuencias de detección (%) de *T. denticola* en saliva**

Grupo		<i>T. denticola</i> en saliva					Total
		<10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	<10 <sup>5</sup>	>10 <sup>6</sup>	>10 <sup>7</sup>	
Periodontitis crónica	N	4	2	8	8	2	24
	% dentro de grupo	16.7%	8.3%	33.3%	33.3%	8.3%	100%
	Residuo corregido	-2.7	-1.8	1.3	3.1	1.4	
Control	N	13	7	4	0	0	24
	% dentro de grupo	54.2%	29.2%	16.7%	0%	0%	100%
	Residuo corregido	2.7	1.8	-1.3	-3.1	-1.4	
Total	N	17	9	12	8	2	48
	% dentro de grupo	35.4%	18.8%	25%	16.7%	4.2%	100%

#### 4.3. Concordancia entre la muestra de FCG y saliva para la detección de bacterias periodontopatógenas

##### *A. actinomycetemcomitans*

Se observó concordancia estadísticamente significativa entre ambos métodos de toma de muestras para la detección de *A. actinomycetemcomitans*, según test  $\chi^2$  ( $p < 0.001$ ), con un grado de concordancia alto ( $\kappa = 0.778$ ). 6 sujetos fueron positivos en muestra de saliva, siendo 4 positivos también en muestra de FCG, apareciendo 2 falsos-positivos en muestra de saliva. De los 44 pacientes negativos en muestra de FCG, la saliva identificó a 42 (Tabla 27).

La sensibilidad de la saliva para detectar *A. actinomycetemcomitans*, tomando como referencia estándar la muestra en FCG, fue del 100% y la especificidad del 95%. El valor predictivo positivo y negativo fueron del 67% y del 100%, respectivamente.

Cuando la saliva se tomó como referencia, la muestra en FCG mostró una sensibilidad del 67%, especificidad del 100% y un valor predictivo positivo y negativo del 100% y 95%, respectivamente.

**Tabla 27. Tabla de contingencia 2x2, relacionando frecuencia de detección en FCG y saliva para *A. actinomycetemcomitans***

			<i>A. actinomycetemcomitans</i> FCG		Total
			Test +	Test -	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>  saliva	Test +	n	4	2	6
		% dentro de <i>A.a</i> en FCG	100%	4.5%	12.5%
	Test -	n	0	42	42
		% dentro de <i>A.a</i> en FCG	0%	95.5%	87.5%
Total		n	4	44	48
		% dentro de <i>A.a</i> en FCG	100%	100%	100%

*A.a:* *A. actinomycetemcomitans*

### *P. gingivalis*

Para la detección de *P. gingivalis*, según el test  $\chi^2$ , existía una concordancia estadísticamente significativa entre la muestra de FCG y saliva ( $p < 0.001$ ), con un grado de concordancia alto ( $\kappa = 0.751$ ). De los 25 pacientes positivos para *P. gingivalis* en muestra de FCG, la saliva detectó a 20 sujetos, apareciendo 5 falsos-negativos. De los 23 individuos negativos en muestra de FCG, la saliva detectó 22, apareciendo 1 falso-positivo (Tabla 28).

La sensibilidad de la saliva, tomando como referencia la muestra de FCG para detectar *P. gingivalis* fue del 80% y la especificidad del 96%. El valor predictivo positivo y negativo fueron del 95% y del 81%, respectivamente.

Cuando la saliva se tomó como referencia, la muestra en FCG mostró una sensibilidad del 95%, especificidad del 81% y un valor predictivo positivo y negativo del 80% y 96%, respectivamente.

**Tabla 28. Tabla de contingencia 2x2, relacionando frecuencia de detección en FCG y saliva para *P. gingivalis***

			<i>P. gingivalis</i> FCG		Total
			Test +	Test -	
<i>P. gingivalis</i>  saliva	Test +	n	20	1	21
		% dentro de <i>P.g</i> en FCG	80%	4.3%	43.8%
	Test -	n	5	22	27
		% dentro de <i>P.g</i> en FCG	20%	95.7%	56.3%
Total		n	25	23	48
		% dentro de <i>P. g</i> en FCG	100%	100%	100

*P.g:* *P. gingivalis*

*P. intermedia*

Se observó concordancia estadísticamente significativa entre ambos métodos de toma de muestras para la detección de *P. intermedia*, según el test  $\chi^2$  ( $p=0.007$ ), con un grado de concordancia bajo ( $kappa=0.263$ ). De los 18 sujetos positivos en muestra de FCG para *P. intermedia*, solo 4 fueron positivos en muestra de saliva, apareciendo 14 falsos negativos. La muestra de saliva detectó a los 30 pacientes que fueron negativos en muestra de FCG (Tabla 29).

Los resultados expuestos, hacen que la sensibilidad de la muestra de saliva, tomando como referencia estándar la muestra de FCG para detectar *P. intermedia* fuera del 22% y la especificidad del 100%. El valor predictivo positivo y negativo para la muestra en FCG fueron del 100% y del 68%, respectivamente.

Cuando la saliva se tomó como referencia, la muestra en FCG mostró una sensibilidad del 100%, especificidad del 68% y un valor predictivo positivo y negativo del 22% y 100%, respectivamente.

**Tabla 29. Tabla de contingencia 2x2, relacionando frecuencia de detección en FCG y saliva para *P. intermedia***

			<i>P. intermedia</i> FCG		Total
			Test +	Test -	
<i>P. intermedia</i>  saliva	Test +	n	4	0	4
		% dentro de <i>P.i</i> FCG	22.2%	0%	8.3%
	Test -	n	14	30	44
		% dentro de <i>P.i</i> FCG	77.8%	100%	91.7%
Total		n	18	30	48
		% dentro de <i>P.i</i> FCG	100%	100%	100%

*P.i: P. intermedia*

*T. forsythia*

Para *T. forsythia*, según el test  $\chi^2$ , la concordancia entre la muestra de FCG y saliva no fue estadísticamente significativa ( $p=0.223$ ), existiendo un grado de concordancia muy bajo ( $kappa=0.171$ ). De los 31 pacientes positivos a *T. forsythia* en muestra de FCG, solo 25 lo fueron en saliva, apareciendo 6 falsos negativos. De los 17 negativos en muestra de FCG, solo 6 lo fueron también en saliva, apareciendo 11 falsos positivos (Tabla 30).

La sensibilidad de la saliva, tomando como referencia estándar la muestra en FCG para detectar *T. forsythia* fue del 81% y la especificidad del 35%. El valor predictivo positivo y negativo fueron del 69% y del 50%, respectivamente.

Cuando la saliva se tomó como referencia, la muestra en FCG mostró una sensibilidad del 69%, especificidad del 50% y un valor predictivo positivo y negativo del 81% y 35%, respectivamente.

**Tabla 30. Tabla de contingencia 2x2, relacionando frecuencia de detección en FCG y saliva para *T. forsythia***

			<i>T. forsythia</i> FCG		Total
			Test +	Test -	
<i>T. forsythia</i> saliva	Test +	n	25	11	36
		% dentro de <i>T.f</i> FCG	80.6%	64.7%	75%
	Test -	n	6	6	12
		% dentro de <i>T.f</i> FCG	19.4%	35.3%	25%
Total		n	31	17	48
		% dentro de <i>T.f</i> FCG	100%	100%	100%

*T.f.*: *T. forsythia*

### *T. denticola*

Para *T. denticola*, la concordancia entre ambos métodos de toma de muestras fue estadísticamente significativa, según test  $\chi^2$  ( $p=0.002$ ), con un grado de concordancia moderado ( $kappa=0.404$ ). De los 20 pacientes positivos a *T. denticola* en FCG, 18 lo fueron también en saliva, hallándose 2 falsos negativos. Sin embargo, de los 28 sujetos negativos en FCG, solo 15 lo fueron en saliva, apareciendo 13 falsos positivos (Tabla 31).

La sensibilidad de la muestra en saliva, tomando como referencia la muestra en FCG, para detectar *T. denticola* fue del 90% y la especificidad del 54%. El valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo fueron del 58% y del 88%, respectivamente.

Cuando la saliva se tomó como referencia, la muestra en FCG mostró una sensibilidad del 58%, especificidad del 88% y un valor predictivo positivo y negativo del 90% y 54%, respectivamente.

**Tabla 31. Tabla de contingencia 2x2, relacionando frecuencia de detección en FCG y saliva para *T. denticola***

			<i>T. denticola</i> FCG		Total
			Test +	Test -	
<i>T. denticola</i> saliva	Test +	n	18	13	31
		% dentro de <i>T.d</i> FCG	90%	46.8%	64.6%
	Test -	n	2	15	17
		% dentro de <i>T.d</i> FCG	10%	53.6%	35.4%
Total		n	20	28	48
		% dentro de <i>T.d</i> FCG	100%	100%	100%

*T.d:* *T. denticola*

## 5. ASOCIACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS Y MICROBIOLÓGICOS

### CMV

Al no detectarse ADN de CMV en ninguna muestra de FCG y saliva, no pudo establecerse asociación con los parámetros clínicos analizados en el estudio.

### VEB

Según el test *t*-Student y Mann-Whitney, la presencia de VEB en muestra de FCG y saliva no tuvo una asociación estadísticamente significativa al 95% con ninguno de los parámetros clínicos evaluados (índice de placa, profundidad de sondaje, nivel de inserción clínico e índice de sangrado al sondaje) (Tablas 32 y 33).

**Tabla 32. Relación entre la presencia o ausencia de VEB en FCG y parámetros clínicos estudiados, expresados como media (DE)**

	IP (%)	PS (mm)	NIC (mm)	BOP (%)
<b>VEB (+)</b> (n = 1)	3.57	2.13	2.13	0.59
<b>VEB (-)</b> (n = 47)	39.36 (30.81)	2.73 (0.93)	3.03 (1.24)	22.97 (21.82)
<b>p-valor (<i>t</i>-Student)</b>	0.256	0.528	0.479	0.315
<b>p-valor (Mann-Whitney)</b>	0.090	0.857	0.801	0.104

DE: desviación estándar; IP: índice de placa; PS: profundidad de sondaje; NIC: nivel de inserción clínico; BOP: índice de sangrado al sondaje

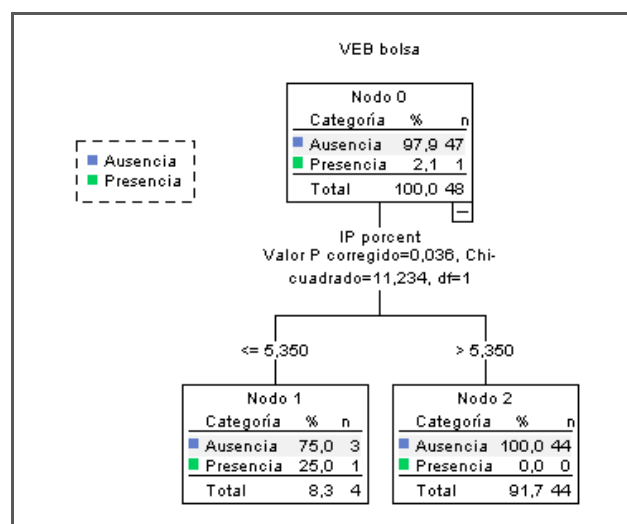
**Tabla 33. Relación entre la presencia o ausencia de VEB en saliva y parámetros clínicos estudiados, expresados como media (DE)**

	IP (%)	PS (mm)	NIC (mm)	BOP (%)
<b>VEB (+)</b> (n = 8)	32.99 (34.67)	2.67 (1.07)	3.04 (1.54)	19.15 (22.57)
<b>VEB (-)</b> (n = 40)	39.74 (30.47)	2.73 (0.91)	3.01 (1.19)	23.18 (21.91)
<b>p-valor (t-Student)</b>	0.578	0.874	0.946	0.639
<b>p-valor (Mann-Whitney)</b>	0.454	0.968	0.946	0.881

DE: desviación estándar IP: índice de placa PS: profundidad de sondaje; NIC: nivel de inserción clínico; BOP: índice de sangrado al sondaje

Se construyó un árbol de clasificación para dos de las variables principales, presencia de VEB en muestra de FCG y en saliva, analizando el impacto de las variables independientes evaluadas. No se realizó para CMV al no hallarse en ninguna muestra de FCG o saliva.

El análisis del árbol de clasificación, según el test  $\chi^2$ , mostró que la medida que segmentaba de forma estadísticamente significativa ( $p=0.036$ ) a VEB en muestra de FCG era el porcentaje de índice de placa, de forma que, cuando el índice de placa era menor o igual a 5.35, aumentaba la probabilidad de que el VEB estuviera presente (25% respecto a un 2.1% inicial), mientras que si era mayor de 5.35, no había presencia de VEB. El árbol clasificaba bien al 97.9% de los casos (Figura 17).



**Figura 17. Árbol de decisión: presencia de VEB en muestra de FCG**  
IP: índice de placa

En saliva, el análisis del árbol de clasificación no detectó ninguna medida o variable que lo segmentara significativamente (Figura 18).

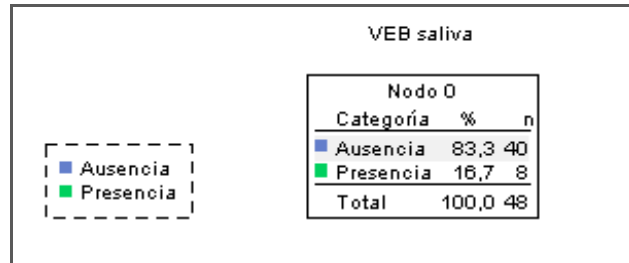


Figura 18. Árbol de decisión: presencia de VEB en muestra de saliva

#### *A. actinomycetemcomitans*

No se observó asociación estadísticamente significativa al 95% entre la presencia de *A. actinomycetemcomitans* en muestra de FCG y saliva con los variables clínicas evaluadas (índice de placa, profundidad de sondaje, nivel de inserción clínico e índice de sangrado al sondaje) (Tablas 34 y 35).

**Tabla 34. Relación entre la presencia o ausencia de *A. actinomycetemcomitans* en FCG y parámetros clínicos estudiados, expresados como media (DE)**

	IP (%)	PS (mm)	NIC (mm)	BOP (%)
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (+) (n = 4)	47.70 (25.09)	2.80 (0.83)	3.55 (1.45)	34.83 (23.59)
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (-) (n = 44)	37.79 (31.50)	2.71 (0.94)	2.97 (1.22)	21.39 (21.60)
<i>p</i> -valor ( <i>t</i> -Student)	0.545	0.856	0.376	0.243

DE: desviación estándar; IP: índice de placa; PS: profundidad de sondaje; NIC: nivel de inserción clínico; BOP: índice de sangrado al sondaje.



**Tabla 35. Relación entre la presencia o ausencia de *A. actinomycetemcomitans* en saliva y parámetros clínicos estudiados, expresados como media (DE)**

	IP (%)	PS (mm)	NIC (mm)	BOP (%)
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (+) (n = 6)	48.15 (32.57)	2.69 (0.77)	3.21 (1.29)	31.94 (23.86)
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (-) (n = 42)	37.25 (30.84)	2.72 (0.95)	2.99 (1.24)	21.16 (21.50)
<i>p</i> -valor ( <i>t</i> -Student)	0.425	0.938	0.683	0.263
<i>p</i> -valor (Mann-Whitney)	0.391	0.901	0.732	0.230

DE: desviación estándar; IP: índice de placa; PS: profundidad de sondaje; NIC: nivel de inserción clínico; BOP: índice de sangrado al sondaje

### *P. gingivalis*

En las Tablas 36 y 37 se muestra la asociación entre la presencia de *P. gingivalis* en FCG y saliva, respectivamente, con los parámetros clínicos evaluados.

El índice de placa mostró asociación estadísticamente significativa al 95% con la presencia de *P. gingivalis*, tanto en FCG y en saliva. Dicho índice era mayor cuando dicha bacteria estaba presente en FCG ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney) y en saliva ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney).

Se observó asociación estadísticamente significativa al 95% entre la profundidad de sondaje y la presencia de *P. gingivalis* en FCG ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney) y en saliva ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney).

En relación al nivel de inserción clínico, también se halló asociación estadísticamente significativa al 95% con la presencia de *P. gingivalis*, tanto en muestra de FCG ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney) y saliva ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney).

El sangrado al sondaje mostró asociación estadísticamente significativa al 95% con la presencia de *P. gingivalis*, tanto cuando se encontraba en FCG como en saliva. Dicho índice era mayor cuando *P. gingivalis* estaba presente en FCG ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney) y en saliva ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney).

**Tabla 36. Relación entre la presencia o ausencia de *P. gingivalis* en FCG y parámetros clínicos estudiados, expresados como media (DE)**

	IP (%)	PS (mm)	NIC (mm)	BOP (%)
<i>P. gingivalis</i> (+) (n = 25)	59.48 (23.78)	3.32 (0.74)	3.83 (1.09)	36.68 (19.08)
<i>P. gingivalis</i> (-) (n = 23)	15.93 (19.81)	2.07 (0.62)	2.13 (0.66)	7.10 (12.04)
<i>p</i> -valor ( <i>t</i> -Student)	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<i>p</i> -valor (Mann-Whitney)	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

DE: desviación estándar; IP: índice de placa; PS: profundidad de sondaje; NIC: nivel de inserción clínico; BOP: índice de sangrado al sondaje

**Tabla 37. Relación entre la presencia o ausencia de *P. gingivalis* en saliva y parámetros clínicos estudiados, expresados como media (DE)**

	IP (%)	PS (mm)	NIC (mm)	BOP (%)
<i>P. gingivalis</i> (+) (n = 21)	62.36 (22.39)	3.30 (0.70)	3.75 (0.98)	38.31 (18.52)
<i>P. gingivalis</i> (-) (n = 27)	20.14 (23.07)	2.27 (0.83)	2.44 (1.12)	10.22 (15.47)
<i>p</i> -valor ( <i>t</i> -Student)	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<i>p</i> -valor (Mann-Whitney)	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

DE: desviación estándar; IP: índice de placa; PS: profundidad de sondaje; NIC: nivel de inserción clínico; BOP: índice de sangrado al sondaje

### *P. intermedia*

Se encontró asociación estadísticamente significativa entre el índice de placa con la presencia de *P. intermedia* en FCG ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney), no hallándose asociación con su presencia en saliva ( $p = 0.839$  en *t*-Student;  $p = 0.695$  en Mann-Whitney).

La profundidad de sondaje mostró asociación estadísticamente significativa al 95% cuando *P. intermedia* estaba presente en muestra de FCG ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney), pero no mostró asociación estadísticamente significativa cuando se hallaba en saliva ( $p = 0.163$  en *t*-Student;  $p = 0.332$  en Mann-Whitney).

En relación al nivel de inserción clínico, se observó asociación estadísticamente significativa al 95% con la presencia de *P. intermedia* en muestra de FCG ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney). En saliva, no se halló asociación estadísticamente significativa al 95% ( $p = 0.494$  en *t*-Student;  $p = 0.601$  en Mann-Whitney).

Entre el índice de sangrado al sondaje y la presencia de *P. intermedia* en muestra de FCG ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney) se halló asociación estadísticamente significativa al 95%. Sin embargo, en saliva, no se encontró asociación estadísticamente significativa al 95% ( $p = 0.758$  en *t*-Student;  $p = 0.576$  en Mann-Whitney).

En las Tablas 38 y 39 se muestra la asociación entre la presencia de *P. gingivalis* en FCG y saliva, respectivamente, con los parámetros clínicos analizados.

**Tabla 38. Relación entre la presencia o ausencia de *P. intermedia* en FCG y parámetros clínicos estudiados, expresados como media (DE)**

	IP (%)	PS (mm)	NIC (mm)	BOP (%)
<i>P. intermedia</i> (+) (n = 18)	62.02 (19.63)	3.58 (0.71)	4.05 (1.01)	38.29 (15.48)
<i>P. intermedia</i> (-) (n = 30)	24.57 (27.92)	2.20 (0.60)	2.39 (0.91)	13.04 (19.61)
<i>p</i> -valor ( <i>t</i> -Student)	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<i>p</i> -valor (Mann-Whitney)	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

DE: desviación estándar; IP: índice de placa; PS: profundidad de sondaje; NIC: nivel de inserción clínico; BOP: índice de sangrado al sondaje

**Tabla 39. Relación entre la presencia o ausencia de *P. intermedia* en saliva y parámetros clínicos estudiados, expresados como media (DE)**

	IP (%)	PS (mm)	NIC (mm)	BOP (%)
<i>P. intermedia</i> (+) (n = 21)	41.67 (18.93)	3.35 (1.22)	3.43 (1.27)	25.78 (15.24)
<i>P. intermedia</i> (-) (n = 27)	38.34 (31.92)	2.66 (0.89)	2.98 (1.24)	22.21 (22.44)
<i>p</i> -valor ( <i>t</i> -Student)	0.839	0.163	0.494	0.758
<i>p</i> -valor (Mann-Whitney)	0.695	0.332	0.601	0.576

DE: desviación estándar; IP: índice de placa; PS: profundidad de sondaje; NIC: nivel de inserción clínico; BOP: índice de sangrado al sondaje

*T. forsythia*

En las Tablas 40 y 41 se muestra la asociación entre la presencia de *T. forsythia* en FCG y saliva, respectivamente, con los parámetros clínicos evaluados.

El índice de placa mostró asociación estadísticamente significativa al 95% con la presencia de *T. forsythia* en FCG ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney). Sin embargo, no se halló dicha asociación cuando estaba presente en saliva ( $p = 0.605$  en *t*-Student;  $p = 0.306$  en Mann-Whitney).

Se observó asociación estadísticamente significativa al 95% entre la presencia de *T. forsythia* y la profundidad de sondaje, cuando se hallaba en muestra de FCG ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney). Sin embargo, no se detectó asociación estadísticamente significativa al 95% cuando *T. forsythia* se encontraba en saliva ( $p = 0.756$  en *t*-Student;  $p = 0.868$  en Mann-Whitney).

El nivel de inserción clínico mostró asociación estadísticamente significativa al 95% con la presencia de dicha bacteria en FCG ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney), no encontrándose dicha asociación en saliva ( $p = 0.592$  en *t*-Student;  $p = 0.868$  en Mann-Whitney).

También se observó que la presencia de *T. forsythia* en FCG mostraba una asociación estadísticamente significativa al 95% con el índice de sangrado al sondaje ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney), no hallándose dicha asociación en saliva ( $p < 0.893$  en *t*-Student;  $p = 0.877$  en Mann-Whitney).

**Tabla 40. Relación entre la presencia o ausencia de *T. forsythia* en FCG y parámetros clínicos estudiados, expresados como media (DE)**

	IP (%)	PS (mm)	NIC (mm)	BOP (%)
<i>T. forsythia</i> (+) (n = 4)	51.20 (28.81)	3.10 (0.90)	3.47 (1.17)	30.43 (21.07)
<i>T. forsythia</i> (-) (n = 40)	15.66 (19.62)	2.03 (0.47)	2.19 (0.92)	8.06 (14.98)
<i>p</i> -valor ( <i>t</i> -Student)	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<i>p</i> -valor (Mann-Whitney)	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

DE: desviación estándar; IP: índice de placa; PS: profundidad de sondaje; NIC: nivel de inserción clínico; BOP: índice de sangrado al sondaje

**Tabla 41. Relación entre la presencia o ausencia de *T. forsythia* en saliva y parámetros clínicos estudiados, expresados como media (DE)**

	IP (%)	PS (mm)	NIC (mm)	BOP (%)
<i>T. forsythia</i> (+) (n = 36)	39.97 (29.98)	2.70 (0.82)	2.96 (1.10)	22.26 (20.73)
<i>T. forsythia</i> (-) (n = 12)	34.55 (34.63)	2.79 (1.24)	3.18 (1.62)	23.25 (25.85)
<i>p</i> -valor ( <i>t</i> -Student)	0.605	0.756	0.592	0.893
<i>p</i> -valor (Mann-Whitney)	0.306	0.868	0.868	0.877

DE: desviación estándar; IP: índice de placa; PS: profundidad de sondaje; NIC: nivel de inserción clínico; BOP: índice de sangrado al sondaje

### *T. denticola*

En relación al índice de placa, se observó asociación estadísticamente significativa al 95% con la presencia de *T. denticola*, tanto en FCG ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney), como en saliva ( $p = 0.004$  en *t*-Student;  $p = 0.008$  en Mann-Whitney).

Se observó asociación estadísticamente significativa al 95% en profundidad de sondaje cuando *T. denticola* estaba presente en muestra de FCG ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p = 0.001$  en Mann-Whitney) y en saliva ( $p = 0.021$  en *t*-Student;  $p = 0.041$  en Mann-Whitney).

El nivel de inserción clínico mostró asociación estadísticamente significativa al 95% con la presencia de dicha bacteria en FCG ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney). En saliva, se halló asociación estadísticamente significativa al 95% según el test de Mann-Whitney ( $p = 0.047$ ), pero no según el test *t*-Student ( $p = 0.074$ ).

El índice de sangrado al sondaje estaba asociado de forma estadísticamente significativa al 95% con la presencia de *T. denticola* en FCG ( $p < 0.001$  en *t*-Student;  $p < 0.001$  en Mann-Whitney). En saliva, se halló asociación estadísticamente significativa al 95% según el test de Mann-Whitney ( $p = 0.027$ ), pero no según el test *t*-Student ( $p = 0.06$ ).

En las Tablas 42 y 43 se resume la asociación entre la presencia de *T. denticola* en FCG y saliva, respectivamente, con los parámetros clínicos evaluados.

**Tabla 42. Relación entre la presencia o ausencia de *T. denticola* en FCG y parámetros clínicos estudiados, expresados como media (DE)**

	IP (%)	PS (mm)	NIC (mm)	BOP (%)
<i>T. denticola</i> (+) (n = 20)	63.37 (20.57)	3.51 (0.72)	3.98 (0.97)	41.18 (16.72)
<i>T. denticola</i> (-) (n = 28)	19.50 (21.37)	2.16 (0.58)	2.32 (0.90)	9.17 (13.79)
<i>p</i> -valor ( <i>t</i> -Student)	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<i>p</i> -valor (Mann-Whitney)	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

FCG: fluido crevicular gingival; DE: desviación estándar; IP: índice de placa; PS: profundidad de sondaje; NIC: nivel de inserción clínico; BOP: índice de sangrado al sondaje

**Tabla 43. Relación entre la presencia o ausencia de *T. denticola* en saliva y parámetros clínicos estudiados, expresados como media (DE)**

	IP (%)	PS (mm)	NIC (mm)	BOP (%)
<i>T. denticola</i> (+) (n = 31)	47.75 (31.23)	2.95 (0.92)	3.25 (1.19)	26.88 (21.45)
<i>T. denticola</i> (-) (n = 17)	21.96 (22.85)	2.31 (0.79)	2.58 (1.23)	14.53 (20.81)
<i>p</i> -valor ( <i>t</i> -Student)	0.004	0.021	0.074	0.060
<i>p</i> -valor (Mann-Whitney)	0.008	0.041	0.047	0.027

DE: desviación estándar; IP: índice de placa; PS: profundidad de sondaje; NIC: nivel de inserción clínico; BOP: índice de sangrado al sondaje

## 6. ASOCIACIÓN ENTRE PATÓGENOS EN MUESTRAS DE FCG Y SALIVA

### 6.1. Asociación CMV-VEB

No se detectó ninguna asociación estadísticamente significativa entre CMV y VEB en FCG ni en saliva, al no detectarse en ningún sujeto ADN de CMV en ninguna muestra.

### 6.2. Asociación entre el VEB y bacterias periodontopatógenas

En muestra de FCG, según el test  $\chi^2$ , no se observó asociación estadísticamente significativa al 95% entre la presencia de VEB y *A. actinomycetemcomitans*

( $p=0.761$ ), *P. gingivalis* ( $p=0.292$ ), *P. intermedia* ( $p=0.434$ ), *T. forsythia* ( $p=0.172$ ) o *T. denticola* ( $p=0.393$ ).

En saliva, según el test  $\chi^2$ , tampoco se observó asociación estadísticamente significativa al 95% entre la presencia de VEB y *A. actinomycetemcomitans* ( $p=0.242$ ), *P. gingivalis* ( $p=0.696$ ), *P. intermedia* ( $p=0.350$ ), *T. forsythia* ( $p=0.074$ ) o *T. denticola* ( $p=0.345$ ).

Las asociaciones entre el VEB y las cinco bacterias periodontopatógenas evaluadas en muestras de FCG y saliva se resumen en la Tabla 44.

**Tabla 44. Asociación entre presencia de VEB y bacterias periodontopatógenas en FCG y saliva**

	FCG			Saliva		
	VEB (+) n (%)	VEB (-) n (%)	<i>p</i> -valor	VEB (+) n (%)	VEB (-) n (%)	<i>p</i> -valor
<i>A. a</i> (+)	0 (0%)	4 (100%)	0.761	0 (0%)	6 (100%)	0.242
<i>A. a</i> (-)	1 (2.3%)	43 (97.7%)		8 (19%)	34 (81%)	
<i>P. g</i> (+)	0 (0%)	25 (100%)	0.292	3 (14.3%)	18 (85.7%)	0.696
<i>P. g</i> (-)	1 (4.3%)	22 (95.7%)		5 (18.5%)	22 (81.5%)	
<i>P. i</i> (+)	0 (0%)	18 (100%)	0.434	0 (0%)	4 (100%)	0.350
<i>P. i</i> (-)	1 (3.3%)	29 (96.7%)		8 (18.2%)	36 (81.8%)	
<i>T. f</i> (+)	0 (0%)	31 (100%)	0.172	4 (11.1%)	32 (88.9%)	0.074
<i>T. f</i> (-)	1 (5.9%)	16 (94.1%)		4 (33.3%)	8 (66.7%)	
<i>T. d</i> (+)	0 (0%)	20 (100%)	0.393	4 (12.9%)	27 (87.1%)	0.345
<i>T. d</i> (-)	1 (3.6%)	27 (96.4%)		4 (23.5%)	13 (76.5%)	

*A. a*: *A. actinomycetemcomitans*; *P. g*: *P. gingivalis*; *P. i*: *P. intermedia*; *T. f*: *T. forsythia*; *T. d*: *T. denticola*; (+): presencia; (-): ausencia

### 6.3. Asociación entre bacterias periodontopatógenas

Respecto a *A. actinomycetemcomitans* (Tabla 45), en FCG, según test de  $\chi^2$ , no se observó asociación estadísticamente significativa al 95% con *P. gingivalis* ( $p=0.338$ ), *P. intermedia* ( $p=0.106$ ), *T. forsythia* ( $p=0.649$ ) o *T. denticola* ( $p=0.073$ )

En saliva, según el test  $\chi^2$  (Tabla 45), no se halló asociación estadísticamente significativa al 95% entre *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* ( $p=0.226$ ), *P. intermedia* ( $p=0.430$ ), *T. forsythia* ( $p=0.131$ ) o *T. denticola* ( $p=0.052$ ).

**Tabla 45. Asociación entre presencia de *A. actinomycetemcomitans* con *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola* en FCG y saliva**

	FCG			SALIVA		
	<i>A. a</i> (+) n (%)	<i>A. a</i> (-) n (%)	<i>p</i> - valor	<i>A. a</i> (+) n (%)	<i>A. a</i> (-) n (%)	<i>p</i> - valor
<i>P.g</i> (+) <i>P.g</i> (-)	3 (75%) 1 (25%)	22 (50%) 22 (50%)	0.338	4 (66.7%) 2 (33.3%)	17 (40.5%) 25 (59.5%)	0.226
<i>P.i</i> (+) <i>P.i</i> (-)	3 (75%) 1 (25%)	15 (34.1%) 29 (65.9%)	0.106	1 (16.7%) 5 (83.3%)	3 (7.1%) 39 (92.9%)	0.430
<i>T.f</i> (+) <i>T.f</i> (-)	23 (92%) 2 (8%)	8 (34.8%) 15 (65.2%)	0.649	1 (16.7%) 5 (83.3%)	3 (7.1%) 39 (92.9%)	0.131
<i>T.d</i> (+) <i>T.d</i> (-)	18 (72%) 7 (28%)	2 (8.7%) 21 (91.3%)	0.073	6 (100%) 0 (0%)	25 (59.5%) 17 (40.5%)	0.052

FCG: fluido crevicular gingival; *A. a*: *A. actinomycetemcomitans*; *P. g*: *P. gingivalis*; *P. i*: *P. intermedia*; *T. f*: *T. forsythia*; *T. d*: *T. denticola*; (+): presencia; (-): ausencia

Al analizar las asociaciones en FCG de *P. gingivalis*, según el test  $\chi^2$ , se observó asociación estadísticamente significativa al 95% con *P. intermedia* ( $p < 0.001$ ), con una OR de 7.36 (IC 95%: 1.89-28.57). Con *T. forsythia* la relación también fue estadísticamente significativa al 95% ( $p < 0.001$ ), con una OR de 2.64 (IC 95%: 1.49-4.68). Así mismo, la relación fue estadísticamente significativa al 95% con *T. denticola* ( $p < 0.001$ ), con una OR de 8.28 (IC 95%: 2.15-31.83). Las OR mostradas indicaban que la probabilidad de detectar *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola* en una localización era 7.36, 2.64 y 8.28 veces mayor, respectivamente, cuando *P. gingivalis* estaba presente que cuando estaba ausente (Tabla 46).

En saliva, según el test  $\chi^2$ , se halló asociación estadísticamente significativa al 95% con *T. denticola* ( $p = 0.037$ ), con una OR de 1.56 (IC 95%: 1.02-2.37). Sin embargo, no se observó asociación con *P. intermedia* ( $p = 0.188$ ) o con *T. forsythia* ( $p = 0.131$ ) (Tabla 46).



**Tabla 46. Asociación entre presencia de *P. gingivalis* con *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola* en FCG y saliva**

	FCG			SALIVA		
	<i>P. g</i> (+) n (%)	<i>P. g</i> (-) n (%)	<i>p</i> -valor	<i>P. g</i> (+) n (%)	<i>P. g</i> (-) n (%)	<i>p</i> -valor
<i>P. i</i> (+)	16 (64%)	2 (8.7%)	< 0.001	3 (14.3%)	1 (3.7%)	0.188
<i>P. i</i> (-)	9 (36%)	21 (91.3%)		18 (85.7%)	26 (96.3%)	
<i>T. f</i> (+)	23 (92%)	8 (34.8%)	< 0.001	18 (85.7%)	18 (66.7%)	0.131
<i>T. f</i> (-)	2 (8%)	15 (65.2%)		3 (14.3%)	9 (33.3%)	
<i>T. d</i> (+)	18 (72%)	2 (8.7%)	< 0.001	17 (81%)	14 (51.9%)	0.037
<i>T. d</i> (-)	7 (28%)	21 (91.3%)		4 (19%)	13 (48.1%)	

FCG: fluido crevicular gingival; *P. g*: *P. gingivalis*; *P. i*: *P. intermedia*; *T. f*: *T. forsythia*; *T. d*: *T. denticola*; (+): presencia; (-): ausencia

En FCG, según el test  $\chi^2$ , *P. intermedia* estaba asociada de forma estadísticamente significativa al 95% con *T. forsythia* ( $p=0.001$ ), con una OR de 2.02 (IC 95%: 1.35-3.01); es decir, la probabilidad de detectar *T. forsythia* en una localización en la que estaba presente *P. intermedia* era 2.02 veces mayor que cuando *P. intermedia* no estaba presente. Así mismo, se encontró asociación estadísticamente significativa al 95% con *T. denticola* ( $p<0.001$ ), con una OR de 9.44 (IC 95%: 3.2-27.79) (Tabla 47).

En saliva, no se encontró asociación estadísticamente significativa al 95%, según el test  $\chi^2$ , entre *P. intermedia* y *T. forsythia* ( $p=0.228$ ) o entre *P. intermedia* y *T. denticola* ( $p=0.122$ ) (Tabla 47).

**Tabla 47. Asociación entre presencia de *P. intermedia* con *T. forsythia* y *T. denticola* en FCG y saliva**

	FCG			SALIVA		
	<i>P. i</i> (+) n (%)	<i>P. i</i> (-) n (%)	<i>p</i> -valor	<i>P. i</i> (+) n (%)	<i>P. i</i> (-) n (%)	<i>p</i> -valor
<i>T. f</i> (+)	17 (94.4%)	14 (46.7%)	0.001	4 (100%)	32 (72.7%)	0.228
<i>T. f</i> (-)	1 (5.6%)	16 (53.3%)		0 (0%)	12 (27.3%)	
<i>T. d</i> (+)	17 (94.4%)	3 (10%)	< 0.001	4 (100%)	27 (61.4%)	0.122
<i>T. d</i> (-)	1 (5.6%)	27 (90%)		0 (0%)	17 (38.6%)	

FCG: fluido crevicular gingival; *P. i*: *P. intermedia*; *T. f*: *T. forsythia*; *T. d*: *T. denticola*; (+): presencia; (-): ausencia

La asociación entre *T. forsythia* y *T. denticola* en FCG fue estadísticamente significativa al 95%, según el test  $\chi^2$  ( $p < 0.001$ ), con una OR de 10.41 (IC 95%: 1.52-71.2), lo cual indicaba que la probabilidad de hallar *T. denticola* en saliva cuando *T. forsythia* estaba presente era 10.41 veces mayor que cuando *T. forsythia* estaba ausente (Tabla 48).

En saliva, también se halló asociación estadísticamente significativa al 95%, según test de  $\chi^2$ , entre la presencia de *T. forsythia* y *T. denticola* ( $p = 0.001$ ), con una OR de 3.11 (IC 95%: 1.15-8.41) (Tabla 48).

**Tabla 48. Asociación entre presencia de *T. forsythia* y *T. denticola* en FCG y saliva**

	FCG			SALIVA		
	<i>T. f</i> (+) n (%)	<i>T. f</i> (-) n (%)	<i>p</i> -valor	<i>T. f</i> (+) n (%)	<i>T. f</i> (-) n (%)	<i>p</i> -valor
<i>T. d</i> (+)	19 (94.4%)	1 (5.9%)	<0.001	28 (77.8%)	3 (25%)	0.001
<i>T. d</i> (-)	12 (5.6%)	16 (94.1%)		8 (22.2%)	9 (75%)	

FCG: fluido crevicular gingival; *T. f*: *T. forsythia*; *T. d*: *T. denticola*; (+): presencia; (-): ausencia



## **vii. DISCUSIÓN**



## **1. DETECCIÓN DE ADN DE CMV Y VEB EN SUJETOS CON PERIODONTITIS CRÓNICA Y CONTROLES SANOS, MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL, EN MUESTRAS DE FCG Y SALIVA**

Desde de la década de los años 90, se ha evaluado la posible implicación que los herpesvirus podrían tener en el inicio y desarrollo de las enfermedades gingivales y periodontales. Dentro de los herpesvirus, el CMV y el VEB han sido los más estudiados en estos procesos. En uno de estos primeros trabajos, Contreras y Slots (Contreras y Slots, 1996), en sujetos con periodontitis crónica, detectaron una significativa mayor prevalencia de CMV en muestras de placa subgingival de bolsas profundas que en las superficiales. Posteriormente, autores del mismo grupo, encontraron mayor frecuencia de detección de CMV y VEB en pacientes con periodontitis crónica, observando una asociación significativa con la severidad de la enfermedad (Contreras et al., 1999a). También detectaron coinfección entre ambos virus en las formas avanzadas de la enfermedad y asociación con ciertos patógenos periodontales como *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola*.

Estos resultados se han ido reproduciendo posteriormente por otros grupos de investigadores, por lo que algunos autores han deducido que el CMV y el VEB podrían tener cierto papel en el inicio y/o progresión de las enfermedades periodontales, proponiendo un nuevo modelo etiopatogénico. En dicho modelo, estos herpesvirus tendrían un efecto citotóxico directo en ciertas células, como fibroblastos, queratinocitos y células inflamatorias del periodonto, o producirían daño indirecto mediante una respuesta inmune alterada y el sobrecrecimiento de bacterias periodontopatógenas (Slots, 2005; Slots, 2010; Contreras et al., 2014).

### **1.1. Detección de ADN de CMV y VEB en muestras de FCG**

En lo que se refiere a la detección de CMV en muestras de FCG, en este estudio, mediante PCR en tiempo real (con una sensibilidad de 1 copia/ $\mu$ l), no se halló en ningún sujeto del grupo periodontitis crónica ni del grupo control.

Estos resultados están en relación a los obtenidos en otros estudios realizados en Europa en sujetos con periodontitis crónica. En Reino Unido, tampoco encontraron

ADN de CMV en ninguna muestra de placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica ni en individuos sanos (Nibali et al., 2009). En Eslovenia, se detectó en un 3% de los sujetos con periodontitis crónica, no hallándose en los sujetos sanos (Klemenc et al., 2005). Frecuencias bajas de detección de CMV también se han reportado en Estados Unidos, del 0.3% (Dawson y cols., 2009a), y en Indonesia, del 0% (Amaliya et al., 2015).

Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados en sujetos con periodontitis crónica describen prevalencias mayores a las encontradas en este estudio: del 26.3% en India (Bilichodman et al., 2009), entre el 33% y el 55.8% en Estados Unidos (Contreras y Slots, 1996; Contreras et al., 1999a), del 40% en Jamaica (Michalowicz et al., 2000), entre el 43.3% y el 60% en Turquía (Saygun et al., 2002; Kubar et al., 2005; Saygun et al., 2005) y del 59% en Irán (Chalabi et al., 2008). En Brasil, se detectó ADN de dicho virus en el 50% de los sujetos con periodontitis crónica frente al 56.7% de los controles sanos, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Imbronito et al., 2008b). En Colombia, encontraron una prevalencia del 60% en periodontitis crónica y del 18.1% en los controles, siendo estadísticamente significativa la diferencia entre ambos grupos (Botero et al., 2007). En poblaciones asiáticas, se han observado prevalencias del 34% en Tailandia (Tantivanich y col., 2004) y del 79% en China (Wu et al., 2007).

En periodontitis agresiva, a excepción de dos trabajos realizados en Reino Unido (Nibali et al., 2009) y en Alemania (Stein et al., 2013), que hallaron prevalencias del 0% y del 1.5%, respectivamente, la mayor parte de los estudios han mostrado prevalencias mayores. Así, en Grecia, se detectó en el 59.4% de las localizaciones activas de pacientes con periodontitis de aparición temprana en mantenimiento (Kamma et al., 2001). Prevalencias altas también han sido descritas en jamaicanos con periodontitis juvenil (60%) y en controles sanos (56.7%), sin diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (Michalowicz et al., 2000). Frecuencias de detección similares se han observado en Brasil, del 60% (Imbronito et al., 2008b), entre el 60-78% en Turquía (Yapar et al., 2003; Kubar et al., 2004; Saygun et al., 2004a; Kubar et al., 2005; Saygun et al., 2005), y del 72.7% en Estados Unidos (Ting et al., 2000).

En relación a la detección de ADN de VEB en FCG, mediante PCR en tiempo real (con un límite de detección de 10 copias/μl), en este estudio no se halló en ninguna muestra de los sujetos del grupo periodontitis crónica, detectándose solo en 1 individuo (4.2%) del grupo control, no siendo estadísticamente significativa la diferencia entre ambos grupos.

En periodontitis crónica, resultados similares a los expuestos en nuestro estudio han sido descritos previamente en Reino Unido, del 0% en sujetos con periodontitis crónica y del 10.3% en controles sanos, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Nibali et al., 2009). Otros estudios realizados en Europa, encuentran frecuencias de detección mayores, como en Italia, del 18.1% (Santangelo et al., 2004) o en Grecia, del 54.5% (Konstantinidis et al., 2005). En Turquía se han descrito prevalencias entre el 16.7% y el 65% (Saygun et al., 2002; Kubar et al., 2005; Saygun et al., 2005). En Canadá, se detectó la misma prevalencia, del 23%, en individuos con periodontitis crónica y en sanos (Grenier y col. 2009). En Estados Unidos, Contreras y Slots (Contreras y Slots., 1996) observaron prevalencias del 37% para el VEB-1 y del 22.2% para el VEB-2, resultados similares, si sumamos la prevalencia de ambos subtipos, a los encontrados por Dawson et al. (Dawson et al., 2009a), del 44.6%. En Jamaica, se detectaron prevalencias de VEB-1 en el 45% de los sujetos con periodontitis crónica incipiente (Michalowicz et al., 2000). En poblaciones asiáticas, se han reportado datos del 0% en Tailandia, tanto en individuos con periodontitis y en controles sanos (Tantivanich et al., 2004), del 66% en Japón (Kato et al., 2003) y del 75% en Indonesia (Amaliya et al., 2015).

En periodontitis agresiva, en Reino Unido, se detectaron prevalencias del 3.1% en periodontitis agresiva generalizada y del 25% en localizada (Nibali et al., 2009); del 10.8% en Alemania (Stein et al., 2013), del 22.7% en Italia en sujetos con periodontitis de comienzo temprano (Santangelo et al., 2004) y del 33% en jamaicanos con periodontitis juvenil (Michalowicz et al., 2000). En Grecia, encontraron ADN de VEB en el 43.8% de las bolsas activas de pacientes con periodontitis de comienzo temprano en mantenimiento y en el 12.5% de las estables (Kamma et al., 2001). En Turquía, se han reportado prevalencias altas en individuos con periodontitis agresiva, entre el 70.6% y el 89%, frente a prevalencias inferiores en sujetos sanos, entre 6.3% y el 14% (Yapar et al., 2003; Saygun et al., 2004a; Kubar et al., 2005).



## **1.2. Detección de ADN de CMV y VEB en muestras de saliva**

En este estudio, tampoco se detectó ADN de CMV en ninguna muestra de saliva del grupo periodontitis crónica ni del grupo control. Aunque los trabajos publicados al respecto son escasos y con resultados heterogéneos, otros autores, en Estados Unidos, en sujetos con periodontitis crónica, también observaron una baja prevalencia, del 1.5% (Dawson et al., 2009b). En Israel, encontraron una frecuencia de detección del 15% en pacientes con periodontitis crónica y del 0% en sanos, siendo estadísticamente significativa la diferencia entre ambos grupos (Bilder et al., 2013). En Turquía, se han descrito prevalencias del 50% en sujetos con periodontitis crónica y del 0%, tanto en controles sanos como en edéntulos (Sahin et al., 2009); en Brasil, del 75% en pacientes con periodontitis crónica (Imbronito et al., 2008a).

Respecto a la detección de ADN de VEB en saliva, en nuestro estudio se detectó en 3 individuos del grupo periodontitis crónica (12.5%) y en 5 pacientes del grupo control (20.8%). El sujeto en el que se halló VEB en muestra de FCG, también lo presentó en saliva. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

En este sentido, las cifras de prevalencia del VEB en saliva descritos en otros trabajos son aún más variables que para el CMV, pareciendo ser más prevalente tanto en sujetos con periodontitis y en sanos. Así, en periodontitis crónica, se han reportado datos del 37.5% en Brasil (Imbronito et al., 2008a), del 40% en sujetos con periodontitis frente al 36.8% en controles sanos en Israel (Bilder et al., 2013) y, en Japón, del 48.5% en individuos con periodontitis frente al 15% en sanos (Idesawa et al., 2004; Sugano et al., 2004). Prevalencias mayores han sido encontradas en Turquía, en el 65% de los pacientes con periodontitis (Saygun et al., 2005), dato algo inferior al descrito años posteriores por el mismo grupo, que hallaron ADN de VEB en saliva en el 79% de los sujetos con periodontitis, en el 33% con gingivitis y en el 54% de los pacientes edéntulos (Sahin et al., 2009). En Estados Unidos, en una población de étnia mixta, se reportaron datos del 81.5% (Dawson et al., 2009b).

La heterogeneidad en los datos de prevalencia de ambos virus observada en los estudios, tanto en muestra de FCG y saliva, podría ser debida a diferencias demográficas, de tamaño muestral y, quizás más importantes, metodológicas.

Respecto a las diferencias demográficas, como se ha expuesto, tanto el CMV y el VEB son virus de alta prevalencia en la población y, factores geográficos, socioeconómicos y, posiblemente étnicos, influyan en los resultados (Cannon et al., 2010; Stein et al., 2013; Korndewal et al., 2015). La mayor parte de los estudios que muestran una alta prevalencia de CMV y VEB en FCG y en saliva han sido realizados en poblaciones de América del Sur (Botero et al., 2007; Imbronito et al., 2008a; Imbronito et al., 2008b), en Turquía (Saygun et al., 2002; Yapar et al., 2003; Kubar et al., 2005; Saygun et al., 2005), China (Wu et al., 2007), en afrocaribeños (Michalowicz et al., 2000) o en poblaciones de étnia mixta (Ting et al., 2000), donde la seroprevalencia de estos virus es alta (Cannon et al., 2010).

Rotola et al. (Rotola et al., 2008) encontraron una baja frecuencia de detección de CMV en biopsias gingivales de sujetos caucasianos, sugiriendo que las discrepancias observadas con otros estudios podrían deberse a diferencias en las prevalencias de infección en las distintos grupos étnicos. En este sentido, en un amplio estudio realizado en Estados Unidos sobre la seroprevalencia del CMV, se observó una significativa influencia de la edad (36% en niños frente al 91% en adultos mayores de 80 años) y de la etnia (82% en hispanos, 76% en negros y 51% en blancos no hispanos) (Staras et al., 2006).

En España, son escasas las investigaciones publicadas al respecto. En un trabajo realizado entre los años 1993 y 1994 en la Comunidad de Madrid, se hallaron cifras de seroprevalencia global del CMV del 62.8% (de Ory Manchón et al., 2001). Posteriormente, autores del mismo grupo publicaron los resultados de un estudio longitudinal realizado entre los años 1993 y 1999, también en sujetos de la Comunidad de Madrid, encontrando datos con una tendencia a la baja en todos los grupos de edad, como en la cohorte entre los 6-10 años (56.7% en 1993 frente al 43.7% en 1999) o en individuos entre 31-40 años (90.3% en 1993 frente al 79.1% en 1999) (de Ory et al., 2004).

Respecto a la seroprevalencia del VEB en España, se han reportado cifras del 86% en sujetos mayores de 20 años de la Comunidad de Madrid (Cour et al., 1991) y superiores al 95% en la provincia de Albacete (Pariente et al., 2007).

En este sentido, según la población de estudio, se han descrito diferentes genotipos del CMV (Puchhammer-Stöckl y Görzer, 2006; Manuel et al., 2009; Novak et al., 2011; Hyatt et al., 2014) y del VEB (Puchhammer-Stöckl y Görzer, 2006; Ikegaya et al., 2008; Ikeda et al., 2014), lo cual podría implicar que diferentes variantes genotípicas de la misma especie no tengan el mismo grado de implicación en la patogenia de las enfermedades periodontales. Así, en un estudio realizado en China, se observó que el genotipo gB-II (genotipo II de la glicoproteína B) del CMV predominaba en lesiones de periodontitis crónica, mientras que el genotipo gB-I (genotipo I de la glicoproteína B) era más frecuente en gingivitis y en sanos; el VEB-1 y 2 fueron hallados con mayor frecuencia en sujetos con periodontitis que con gingivitis o en los controles sanos (Wu et al., 2007). Otro factor de susceptibilidad étnica, podría ser el polimorfismo del MHC, el cual juega un importante papel en el reconocimiento de las células T por los antígenos y, por tanto, producir diferente respuesta inmune contra los agentes víricos o bacterianos (Stein et al., 2008). Debido a que los antígenos víricos son presentados por moléculas MHC-I, los polimorfismos en el *loci* del gen de dichas moléculas podrían influir en la susceptibilidad contra las infecciones por herpesvirus (Meng et al., 2007; Stein et al., 2003).

Quizás, la razón más importante de gran parte de las discrepancias de los resultados entre los estudios, puedan ser atribuidas a variables metodológicas, tanto en los criterios de inclusión y exclusión de los sujetos con periodontitis, así como a los diversos métodos de recogida FCG (puntas de papel, cureta y número de localizaciones seleccionadas) y saliva.

Otros factores a considerar serían el método de extracción del ADN de las muestras, paso que juega un papel crítico en el rendimiento y sensibilidad de la técnica de PCR (Smith et al., 2007; Soetens et al., 2008), así como a las diferentes condiciones de amplificación de las PCR (Hayden et al., 2013). Además, los *primers* empleados para la detección de estos herpesvirus variaban notablemente entre los distintos estudios, con un predominio gen IE y del gen de la gB, en el caso de CMV, y del gen EBNA 1 y 2 para el VEB, frente a otros estudios que utilizaban secuencias de oligonucleótidos de desarrollo propio, lo cual podría condicionar los resultados (Smith et al., 2007; Bergallo et al., 2008; Habbal et al., 2009). En nuestro trabajo, se empleó el kit comercial *RealCycler CMEB*<sup>®</sup> (Progenie Molecular, Valencia, España), con *primers* específicos

para amplificar un fragmento de la secuencia del gen de la gB del CMV y del gen LMP1 del VEB (para referencias, consultar Tablas 5 y 6).

En relación a las técnicas de PCR, es preciso resaltar que la alta sensibilidad de ciertas técnicas moleculares, como la PCR anidada, empleada en la mayor parte de los estudios, permite detectar pequeñas cantidades del genoma de estos virus (Rotola et al., 2008), que podrían ser irrelevantes en términos de patogenicidad, o dar lugar a falsos positivos debido a contaminación cruzada durante el procesamiento de la muestra (Botero et al., 2008c; Zhang et al., 2010).

Para resolver este problema, estudios más recientes han desarrollado técnicas menos sensibles pero más específicas, como la PCR en tiempo real, revelando datos de menor prevalencia de estos virus en periodontitis crónica (Dawson et al., 2009a; Nibali et al., 2009) y en periodontitis agresiva (Nibali et al., 2009; Stein et al., 2013), o no han encontrado diferencias entre la carga vírica de bolsas superficiales y profundas (Konstantinidis et al., 2005). Botero et al. (Botero et al., 2008c) compararon la PCR anidada con la PCR en tiempo real para la detección de CMV en muestras subgingivales de pacientes con periodontitis crónica, obteniendo un acuerdo entre ambas técnicas moleculares del 47.7% y del 4.1% en sujetos con periodontitis y controles sanos, respectivamente. La sensibilidad de la PCR en tiempo real, comparándola con la PCR anidada fue del 60% y la especificidad del 100%. Este hecho podría explicar la baja prevalencia de CMV y VEB encontrada en nuestro estudio, que estuvo en acuerdo con los resultados publicados por autores que emplearon PCR en tiempo real para su detección (Dawson et al., 2009a; Nibali et al., 2009; Stein et al., 2013; Amaliya et al., 2015).

Otra de las razones importantes a tener en cuenta en la discrepancia de los resultados, sería debido a diferencias en los límites de detección, ya que en algunos estudios no están especificados o son expresados en diferentes unidades (copias/ml, copias/ $\mu$ l o copias/ng), lo cual hace difícil una estandarización de los resultados (ver Tablas 5 y 6). A la hora de hacer la conversión de las unidades hay que considerar el método de extracción de ADN realizado, el volumen de la muestra y el tipo de termociclador empleado (Espy et al., 2006; Smith et al., 2007), por lo que algunos autores han recomendado tener precaución al utilizar factores de corrección para equiparar las unidades de medición (Espy et al., 2006). El límite de detección de la PCR en tiempo

real realizada en este estudio, según información del fabricante del kit *RealCycler* CMEB<sup>®</sup>, era de 1 copia/ $\mu$ l para el CMV y de 10 copias/ $\mu$ l en el caso del VEB.

Por tanto, los resultados obtenidos a partir de muestras de FCG y de saliva podrían carecer de valor para relacionarlos con la etiopatogenia o la actividad de la enfermedad periodontal, ya que, como se ha expuesto, una vez se produce la primoinfección por estos virus, establecen latencia de por vida en monocitos y linfocitos T (y posiblemente en otras células), en el caso del CMV (Sissons et al., 2002; Contreras et al., 1999a; Contreras et al., 2014), o en los linfocitos B, en el caso del VEB (Contreras et al., 1999a; Hatton et al., 2014; Murata et al., 2014). Dado que estas células se hallan en elevada proporción en los tejidos con periodontitis (Berglundh et al., 2002; Berglundh et al., 2005), la presencia del CMV y VEB en FCG, podría ser discutida.

Respecto a la detección de dichos virus en saliva de los sujetos con periodontitis, hay que recordar que se pueden producir infecciones recurrentes, bien por reinfección con otra cepa o por reactivación de una cepa existente, en la cual la excreción viral en saliva es intermitente, indefinida, e incluso asintomática en los individuos inmunocompetentes (Fafi-Kremer et al., 2005; Grinde et al., 2013; Sanbonmatsu Gámez et al., 2014), lo cual podría explicar su presencia en dicho fluido (Stein et al., 2013).

Además, la detección de ADN en FCG o saliva no diferencia entre infección activa y latencia o persistencia de estos virus. Para discriminar el estado de la infección, se debe probar el aumento de la carga viral en distintas fases de la infección y, para ello, son más apropiadas las muestras de sangre, suero o plasma (Drewl, 2007; de Paschale y Clerici, 2012; Kraft et al., 2012). En este sentido, algunos estudios han evaluado la presencia de anticuerpos IgM e IgG contra el CMV y el VEB en suero o plasma mediante técnica ELISA, observando una alta prevalencia tanto en pacientes con periodontitis y controles sanos (Imbronito 2008a; Konstantinidis et al., 2008; Nibali et al., 2009; Stein et al., 2013). Como se ha expuesto, la seroprevalencia de anticuerpos IgG en la población general es elevada, y su presencia indicaría que estos sujetos presentaron la infección en algún momento de su vida (de Ory et al., 2004; Pariente et al., 2007). Sin embargo, en la literatura, no hay ningún estudio longitudinal que realice el seguimiento de pacientes con periodontitis durante un periodo de tiempo y detecten ADN de estos virus en suero o plasma y se pueda relacionar con la destrucción del periodonto.

### **1.3. Concordancia entre la muestra de FCG y saliva para la detección de ADN de CMV y VEB**

Respecto al CMV, como se ha expuesto, en el presente estudio no se detectó ADN de CMV en ninguna muestra de FCG ni de saliva, por lo que no se realizó el cálculo de la concordancia. Se ha propuesto que su presencia en saliva podría proceder de las bolsas periodontales, debido a la alta correlación entre la frecuencia de detección en saliva y a nivel subgingival (Saygun et al., 2005; Imbronito et al., 2008a; Dawson et al., 2009b; Sahin et al., 2009) y a una menor prevalencia en sanos (Sahin et al., 2009; Bilder et al., 2013) o en pacientes edéntulos (Sahin et al., 2009). La presencia de CMV en bolsas periodontales podría ser debida a la capacidad de dicho patógeno de permanecer latente en linfocitos T (Sissons et al., 2002).

En relación al VEB, no se observó concordancia estadísticamente significativa entre ambos métodos de toma de muestras, siendo el grado de concordancia muy bajo ( $\kappa=0.192$ ). De los 47 pacientes negativos en muestra de FCG (97.9%), 40 también lo fueron en saliva (83.3%), apareciendo 7 falsos negativos. Solo 1 sujeto fue positivo para VEB en muestra de FCG, a diferencia de 8 que se detectaron en saliva. El análisis demostró que la sensibilidad y especificidad de la saliva para detectar VEB era alta (100% y 85%, respectivamente). Sin embargo, la muestra de FCG presentó una sensibilidad del 13% y una especificidad del 100%.

Aunque algunos autores han encontrado una alta correlación entre su detección en saliva y a nivel subgingival (Dawson et al., 2009b), dado que el VEB se encuentra en sujetos con periodontitis y en controles sanos, se ha sugerido que su presencia en saliva podría tener otra procedencia diferente de las bolsas periodontales (Sahin et al., 2009; Bilder et al., 2013).

## **2. DETECCIÓN DE BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS EN SUJETOS CON PERIODONTITIS CRÓNICA Y CONTROLES SANOS, EN MUESTRAS DE FCG Y SALIVA**

En el presente trabajo, se empleó el test micro-IDent<sup>®</sup> (Hain Lifescience, GmbH, Nehren, Alemania), que permite la detección semi-cuantitativa de cinco bacterias periodontopatógenas (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T.*

*forsythia* y *T. denticola*) mediante PCR convencional seguida de hibridación reversa, con un umbral de detección de  $10^3$ - $10^4$  genomas. La validez diagnóstica del test micro-IDent<sup>®</sup> ha sido evaluada en relación al cultivo (Eick y Pfister, 2002) y con la técnica de hibridación ADN-ADN en tablero de ajedrez (Haffajee et al., 2009). En relación al cultivo como referencia, Eick y Pfister (Eick y Pfister, 2002) observaron que el test micro-IDent<sup>®</sup> detectaba con mayor frecuencia *P. gingivalis* y *T. forsythia*, y menos frecuentemente *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans*, por lo que se modificó el umbral de detección para esta última bacteria de  $10^4$  a  $10^3$  genomas. Estos autores obtuvieron un acuerdo en la cuantificación entre ambas técnicas del 70% para *A. actinomycetemcomitans*, del 76% para *P. gingivalis*, del 62% para *P. intermedia*, del 80% para *T. forsythia* y del 78% para *T. denticola* (Eick y Pfister, 2002).

Haffajee et al. (Haffajee et al., 2009) emplearon una nueva versión de este kit, que permitía detectar 13 periodontopatógenos y lo compararon con la hibridación ADN-ADN en tablero de ajedrez como referencia, obteniendo un porcentaje de acuerdo entre ambas técnicas del 74.2%, y una sensibilidad del 56.3% y especificidad del 79.3%. Observaron una alta correlación entre ambas técnicas para la detección de *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *E. nodatum*, *C. rectus*, *P. micra*, *Capnocytophaga ochracea*; una correlación moderada para *T. forsythia* y *E. corrodens* y *A. actinomycetemcomitans*, mientras que fue baja para *P. intermedia*, *Capnocythaga sputigena* y *Capnocytophaga gingivalis*.

## **2.1. Detección de bacterias periodontopatógenas en muestras de FCG**

En nuestro estudio, los microorganismos hallados con mayor frecuencia en el grupo periodontitis crónica fueron *P. gingivalis* (91.7%) y *T. forsythia* (91.7%), seguidos en orden decreciente por *T. denticola* (79.2%), *P. intermedia* (70.8%) y *A. actinomycetemcomitans* (12.5%). En el grupo control, el patógeno más frecuentemente detectado fue *T. forsythia* (37.5%), seguido de *P. gingivalis* (12.5%). Para este grupo, la frecuencia de detección de *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* y *T. denticola* fue de 4.2%. Las diferencias entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas para *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola*, no así para *A. actinomycetemcomitans*.

Respecto a la frecuencia de detección de *A. actinomycetemcomitans*, se halló en un 12.5% de los sujetos con periodontitis crónica y en un 4.2% de los controles sanos, resultados algo inferiores a los descritos en sujetos con periodontitis en España por Lau et al. (Lau et al., 2004), mediante PCR en tiempo real (18.8% en periodontitis y 6.7% en sanos) y por Herrera et al. (Herrera et al., 2008) mediante cultivo (16.7%). En nuestro país, prevalencias inferiores también han sido observadas mediante cultivo por Sanz et al. (Sanz et al., 2000) (3.2%) y por Mínguez et al. (Mínguez et al., 2014) (5.7%). En otras poblaciones, mediante PCR, se han hallado prevalencias en periodontitis crónica por encima del 60% en sujetos de origen chino (Tan et al., 2001) y en Singapur (Tan et al., 2002), así como en periodontitis agresiva en Ghana (Åberg et al., 2012) y Sudán (Elamin et al., 2011). Sin embargo, se han descrito prevalencias inferiores al 30% en periodontitis crónica en Brasil (Roman-Torres et al., 2010), Corea (Kim et al., 2009), Alemania (Jervøe-Storm et al., 2005; Kim et al., 2009) y en periodontitis agresiva en Japón (Thiha et al., 2007).

Una posible explicación para esta discrepancia en los datos de prevalencia podría ser debida a que diferentes serotipos de *A. actinomycetemcomitans* sean más prevalentes en algunas poblaciones (Mínguez et al., 2014), lo cual podría tener diferentes implicaciones en la patogénicidad de dicho microorganismo (Díaz-Zúñiga et al., 2014). De esta forma, se ha descrito que los serotipos “a” y “b” eran más prevalentes en sujetos españoles de étnia caucásica con periodontitis, no detectándose los serotipos “c” y “d” (Mínguez et al., 2014).

*P. gingivalis* fue el patógeno más frecuentemente detectado en FCG en nuestro estudio en los sujetos con periodontitis crónica, con una frecuencia del 91.7%, dato algo superior al reportado por Lau et al. (Lau et al., 2004) mediante PCR (81.3%), o por Sanz et al. (Sanz et al., 2000) (64.5%) y por Herrera et al. (Herrera et al., 2008) (77.8%) con cultivo. Posiblemente, existan importantes diferencias geográficas en la prevalencia de esta bacteria y que en España presente una elevada frecuencia, lo que quedó demostrado en un estudio comparativo realizado mediante cultivo entre España y Holanda (Sanz et al., 2000). Mediante PCR, la mayor parte de los estudios en otras poblaciones han hallado también una alta prevalencia de *P. gingivalis*, superior al 50%, aunque también se advierte cierta heterogeneidad entre distintas localizaciones geográficas. La prevalencia en Japón oscila entre el 60% y el 95% (Takeuchi et al., 2001; Fujise et al., 2002; Tomita et al., 2013), en China del 71% (Deng et al., 2011), en



Corea de un 97% (Lee et al., 2003), en Estados Unidos entre el 50% y el 87% (McClellan et al., 1997; Tuite-McDonnell et al., 1997; Griffen et al., 1999), en Brasil entre el 73% y el 89% (Missailidis et al., 2004; Imbronito et al., 2008b), en Tailandia entre el 71% y el 95% (Torrunguang et al., 2009; Wara-aswapati et al., 2009), y en Reino Unido entre el 67% y el 78% (Ready et al., 2008; Nibali et al., 2012).

En el grupo control, *P. gingivalis* fue hallada en un 12.5%, dato similar al encontrado por Lau et al. (Lau et al., 2004) (13.3%). Sobre la presencia de dicha bacteria en sujetos sanos, se ha conjeturado sobre la existencia de un filotipo no patogénico de *P. gingivalis*, con características fenotípicas similares. Se han descrito especies únicamente presentes en animales, como son *Porphyromonas macacae* y *Porphyromonas gulae*, que presentan similitudes fenotípicas con *P. gingivalis*, aunque no puede descartarse la existencia de subtipos no patogénicos y genéticamente relacionados con esta bacteria (Lau et al., 2004).

*P. intermedia* fue detectada en el 70.8% de los sujetos con periodontitis y en una frecuencia baja en los controles sanos (4.2%). En España, se han observado prevalencias superiores en sujetos con periodontitis crónica (97.2%) (Herrera et al., 2008). Esta discrepancia podría ser debida a la dificultad del cultivo para diferenciar especies fenotípicamente similares como *P. intermedia* y *Prevotella nigrescens* (Cookson et al., 1996), ya que el test micro-IDent<sup>®</sup>, empleado en nuestro estudio, solo detecta *P. intermedia* (Eick y Pfister, 2002). Aunque se ha sugerido que solo *P. intermedia* está relacionada con la profundidad de sondaje (Teanpaisan et al., 1995), otros autores han hallado ambas especies en bolsas profundas (Umeda et al., 1998a).

Otro de los patógenos evaluados fue *T. forsythia*, detectado en un 91.7% en la cohorte de sujetos con periodontitis. En España, la alta prevalencia encontrada en los individuos con periodontitis está en relación al resultado observado por Lau et al. (Lau et al., 2004), mediante PCR en tiempo real (100%), no así con el hallado por Herrera et al. (Herrera et al., 2008), mediante cultivo (36.1%). En un estudio comparativo entre el cultivo y el test micro-IDent<sup>®</sup>, hallaron más frecuentemente *T. forsythia* con dicho kit comercial de PCR que con el cultivo (Eick y Pfister, 2002). Puede que la baja frecuencia de detección del cultivo para esta bacteria se justifique por su lento crecimiento en los medios de cultivo no selectivos, ya que requiere a otras bacterias como *P. gingivalis* o *F. nucleatum* para aportar al medio ácido N-acetil-murámico,

esencial para su crecimiento (Lau et al., 2004). En los controles sanos, en nuestro estudio se halló en un 37.5%, dato inferior al reportado por Lau et al. (Lau et al., 2004) (73.3%) mediante PCR en tiempo real, lo cual podría estar relacionado con los umbrales de detección de las distintas PCR empleadas.

*T. denticola* fue detectada en una alta prevalencia de los sujetos con periodontitis en este trabajo (79.2%), con una diferencia estadísticamente significativa respecto a los controles sanos (4.2%). En España, mediante PCR, otros autores observaron una prevalencia del 48.5% en sujetos con periodontitis crónica (Puig-Silla et al., 2012). Eick y Pfister (Eick y Pfister, 2002), empleando la misma técnica de detección, no hallaron dicha bacteria en los sujetos sanos.

Como se ha expuesto, los motivos de la variedad en los resultados para cada una de las bacterias periodontopatógenas expuestas podrían radicar en los criterios de selección de los pacientes, aspectos metodológicos, diferentes umbrales de detección de las técnicas empleadas, serotipos bacterianos y verdaderas diferencias geográficas.

Respecto a la ***proporción y distribución de frecuencias de detección*** de patógenos hallados en muestra de FCG, las diferencias fueron estadísticamente significativas entre el grupo periodontitis crónica y el grupo control sano para *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola*, no siendo significativa la diferencia para *A. actinomycetemcomitans*.

En este sentido, se ha sugerido que la mera presencia de patógenos periodontales no implica que exista o vaya a desarrollarse la enfermedad, sino que, probablemente, se requieran cantidades por encima de un cierto umbral (Socransky y Haffajee, 1992; Loesche, 1992). Aún así, no está claro cuál es el umbral para que un patógeno inicie la progresión de la enfermedad. Loesche (Loesche, 1992) propuso que, en términos de una correcta clasificación de los pacientes enfermos y sanos, el nivel de detección debería ser alto, por ejemplo  $10^3$  UFC/ml, para que no fueran positivos sujetos sin enfermedad periodontal. Doungudomdacha et al. (Doungudomdacha et al., 2001), mediante PCR cuantitativa, expusieron que se podría asociar un umbral que correspondería aproximadamente a  $2.6 \times 10^4$  UFC/ml de *P. gingivalis* con los primeros signos clínicos de enfermedad.

Por tanto, aunque la susceptibilidad ante los patógenos periodontales específicos varía de un hospedador a otro, basándonos en estudios previos, se han obtenido unos niveles de detección entre  $10^4$  y  $10^6$  cuando estas bacterias se han detectado en las bolsas periodontales activas o cuando estaban asociadas con enfermedades periodontales específicas (Gmür et al., 1989; Dahlén et al., 1990; Haffajee y Socransky, 1994; Dibart et al., 1998; Doungudomdacha et al., 2001).

## **2.2. Detección de bacterias periodontopatógenas en muestras de saliva**

Los métodos microbiológicos empleados para la evaluación del biofilm subgingival son muy variados. Existen diferentes técnicas de toma de muestras, distintas estrategias y numerosos test para analizarlas. El objetivo de cualquier método de toma de muestras es que sea capaz de obtener una muestra representativa del biofilm subgingival (Casas et al., 2007; Nguyen-Hieu et al., 2013).

En este sentido, el método más difundido para determinar la flora subgingival es la toma de muestras de las bolsas periodontales (Haffajee y Socransky, 1992; Haffajee et al., 1998). Sin embargo, dado las ventajas en la sencillez de recolección de la saliva, en este estudio se evaluó la capacidad de la misma para la detección de patógenos periodontales en comparación con la muestra de FCG, considerada como la técnica de referencia.

En muestra de saliva, empleando el test micro-IDent® y mediante PCR convencional e hibridación reversa, en el grupo periodontitis crónica, el patógeno hallado con mayor frecuencia en este estudio fue *T. denticola* (83.3%), seguido en orden decreciente por *P. gingivalis* (79.2%), *T. forsythia* (79.2%), *A. actinomycetemcomitans* (16.7%) y *P. intermedia* (12.5%). En el grupo control, el patógeno más frecuentemente detectado fue *T. forsythia* (70.8%), seguido de *T. denticola* (45.8%), y con menores frecuencias *A. actinomycetemcomitans* (8.3%), *P. gingivalis* (8.3%) y *P. intermedia* (4.2%). De las cinco bacterias evaluadas, solo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos para *P. gingivalis* y *T. denticola*.

Respecto a la presencia de *A. actinomycetemcomitans* en saliva, en otros trabajos que emplearon PCR, se han descrito prevalencias en periodontitis crónica entre el 1.8% y el 19.6% en Finlandia (Paju et al., 2009; Liljestrand et al., 2014), del 9% en Holanda

(Boutaga et al., 2007), del 20% en Estados Unidos (Umeda y col. 1998b), del 48.3% en China (He et al., 2012) y entre el 23.7% y el 56% en Brasil (Cortelli et al., 2005; Vieira et al., 2009). En el grupo control, fue hallada en nuestro estudio en un 8.3%, similar al obtenido por Liljestrand et al. (Liljestrand et al., 2014) en Finlandia, del 9.1%. Los datos reportados en sujetos sanos en otros estudios han sido variables, desde el 1% en Estados Unidos (Leblebicioglu et al., 2009), al 59% en Alemania mediante cultivo (Müller et al., 2001).

*P. gingivalis* fue hallada en nuestro estudio en saliva en el 79.2% de los sujetos con periodontitis crónica y en el 8.2% de los controles sanos, siendo estadísticamente significativa la diferencia. En otras poblaciones, las prevalencias encontradas de esta bacteria en saliva en periodontitis, mediante PCR, han sido muy heterogeneas. Se han publicado datos del 23.5% en Brasil (Estrela et al., 2010), del 33.3% en Holanda (Boutaga et al., 2007), entre el 36.9% y el 70% en Finlandia (Mättö et al., 1998; Liljestrand et al., 2014), del 48% en Estados Unidos (Umeda et al., 1998b) y del 50% en China (He et al., 2012). En individuos periodontalmente sanos, se han observado datos similares a los nuestros en Japón (Takeuchi et al., 2001) y Finlandia (Mättö et al., 1998). Algunos autores han encontrado mayor prevalencia de *P. gingivalis* en saliva con la edad (Mättö et al., 1998; Umeda et al., 1998a; Könönen et al., 2007; Liljestrand et al., 2014), factor que podría tener relación en la diferencia entre ambos grupos, ya que la edad de los sujetos del grupo periodontitis crónica de nuestro estudio es significativamente mayor que la del grupo control.

*P. intermedia* se detectó en la cohorte de sujetos con periodontitis en un 12.5% y en el 4.2% en los controles sanos, no siendo estadísticamente significativa la diferencia. En otras poblaciones, mediante PCR, se han reportado prevalencias superiores en periodontitis a la encontrada en nuestro estudio, entre un 43% en Estados Unidos (Umeda et al., 1998b) y un 82% en Holanda (Boutaga et al., 2007). Las bajas frecuencias de detección encontradas podrían explicarse a la baja sensibilidad del test micro-IDent<sup>®</sup> empleado en el estudio, hecho observado por otros autores, al compararlo con cultivo y con la técnica ADN-ADN en tablero de ajedrez (Eick y Pfister, 2002; Haffajjee et al., 2009). Dado que este test puede detectar *P. intermedia*, pero no *P. nigrescens*, los datos encontrados pueden ser inferiores a los aportados por otros autores en saliva mediante cultivo, ya que este último puede detectar ambas especies (Eick y

Pfister, 2002), o por otro tipo de PCR que permita la diferenciación genotípica entre especies, como la PCR con *primers* arbitrarios o AP-PCR (Mätto et al., 1996).

En relación a *T. forsythia*, en nuestro estudio fue detectada en saliva con una alta prevalencia en los sujetos con periodontitis (79.2%) y en los controles sanos (70.8%), no siendo estadísticamente significativa la diferencia. En periodontitis, mediante PCR, otros autores han reportado prevalencias en saliva de dicha bacteria del 55 % (Umeda et al., 1998b) y del 100% (Boutaga et al., 2007), aunque con cultivo estos últimos investigadores encontraron una frecuencia de detección del 28.6%.

Para *T. denticola*, la frecuencia de detección en saliva en los sujetos con periodontitis fue del 83.3% y del 45.8% en el grupo control, siendo estadísticamente significativa la diferencia. Mediante técnicas de PCR, en otras poblaciones se han reportado prevalencias en periodontitis crónica del 17.1% en Alemania (Beikler et al., 2004), entre el 42% y el 43% en Colombia (Martínez-Pabón et al., 2008; Martínez-Pabón et al., 2010), del 75% en Brasil (Pereira et al., 2012) y del 90.3% en Estados Unidos (Umeda et al., 1998b). En sujetos periodontalmente sanos, se han hallado prevalencias inferiores a la encontrada en nuestro estudio, del 10% en Brasil (Pereira et al., 2012) y entre el 17.9% y el 25.5% en Colombia (Martínez-Pabón et al., 2008; Martínez-Pabón et al., 2010).

Valorando la **proporción y distribución de frecuencias de detección** de los patógenos periodontales en saliva, las diferencias fueron estadísticamente significativas entre el grupo periodontitis crónica y el grupo control sano para *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola*, no siendo significativa la diferencia para *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia*.

Se ha sugerido que el recuento de ciertos patógenos periodontales en saliva, fundamentalmente de *P. gingivalis*, puede ser útil en el diagnóstico de periodontitis (Gursoy et al., 2011; Saygun et al., 2011; Liljestrand et al., 2014; Salminen et al., 2014). Aún así, todavía no se ha establecido cuál es el umbral en saliva para que un patógeno pueda asociarse a enfermedad. Saygun et al. (Saygun et al., 2011), mediante PCR en tiempo real, propusieron que se podría relacionar un umbral que correspondería a  $4 \times 10^4$  copias/ml para *P. gingivalis*, a  $7 \times 10^5$  copias/ml para *T. forsythia* y a  $9 \times 10^5$  copias/ml para *P. intermedia*, con signos clínicos de enfermedad.

Como se puede observar, las investigaciones muestran que la saliva es un nicho adecuado para el estudio del biofilm subgingival, aunque los resultados de los estudios presentan cierta heterogeneidad en la calidad y cantidad bacteriana, posiblemente debido a diferencias en la prevalencia de periodontopatógenos según la población de estudio, variantes de cada especie bacteriana, método de recogida de la saliva y variables metodológicas empleadas. Aunque se ha comprobado la superioridad del nicho subgingival y su relación como nicho primario sobre el resto (Danser et al., 1994), puede que si se quiere controlar la infección de la cavidad oral en conjunto, sea necesario realizar muestras de otras localizaciones orales, como la saliva (Quirynen y van Assche, 2011; de Waal et al., 2014).

### **2.3. Concordancia entre la muestra de FCG y saliva para la detección de bacterias periodontopatógenas**

Considerando la muestra en FCG como referencia, cuando se comparó con la saliva para la detección de *A. actinomycetemcomitans*, se obtuvo una concordancia estadísticamente significativa entre ambos métodos de toma de muestras, con un grado de concordancia alto ( $\kappa=0.778$ ). La sensibilidad y la especificidad de la saliva para detectar *A. actinomycetemcomitans* fue alta (100% y 95%, respectivamente).

Otros autores, mediante cultivo selectivo, también observaron una correlación estadísticamente significativa entre la presencia de dicha bacteria en FGC y en saliva en sujetos con periodontitis (Testa et al., 1999; Cortelli et al., 2005), con una mayor detección en saliva que en muestra subgingival (Asikainen et al., 1991; Mager et al., 2003). Mediante PCR y tecnología de *microarrays*, Haririan et al. (Haririan et al., 2014) hallaron una correlación moderada entre ambas estrategias de toma de muestras y una sensibilidad y especificidad inferiores a las obtenidas en nuestro estudio, del 68.42% y 82.46%, respectivamente. Boutaga et al. (Boutaga et al., 2007), mediante PCR en tiempo real, expusieron que la muestra de lavado bucal (enjuague con suero) tenía una alta sensibilidad (100%) y especificidad (89.5%) para la detección de *A. actinomycetemcomitans*, y la detección era mayor que en muestra subgingival. Sin embargo, Umeda et al. (Umeda et al., 1998b), mediante PCR, observaron menor detección en saliva (20%) respecto a la muestra subgingival (27%), sugiriendo la necesidad de tomar muestras en ambos nichos para su detección.

Cuando se comparó la muestra de FCG y saliva para la detección de *P. gingivalis*, se halló una concordancia estadísticamente significativa, con un grado de concordancia alto ( $\kappa=0.751$ ). De los 25 pacientes positivos a *P. gingivalis* en muestra de FCG, la saliva detectó a 20 pacientes, apareciendo 5 falsos-negativos. De los 23 sujetos negativos en muestra de FCG, la saliva detectó 22, apareciendo 1 falso-positivo. Tomando como referencia la muestra de FCG, la sensibilidad de la saliva para detectar dicho patógeno fue del 80% y la especificidad del 96%. Haririan et al. (Haririan et al., 2014) encontraron una concordancia moderada entre ambas muestras, con una sensibilidad y especificidad del 88.14% y del 82.35%, respectivamente. Otros autores también han reportado resultados similares al respecto, concluyendo que la muestra de saliva o de lavado puede ser tan eficaz o superior a la muestra de FCG para la detección de *P. gingivalis* (Umeda et al., 1998b; Boutaga et al., 2007; Paju et al., 2009).

La concordancia entre la muestra de FCG y saliva para la detección de *P. intermedia*, fue estadísticamente significativa, aunque con un grado de concordancia bajo ( $\kappa=0.263$ ). La saliva solo detectó 4 de los 18 sujetos positivos en muestra de FCG, dando lugar a 14 falsos negativos, aunque sí detectó a los 30 pacientes negativos en muestra de FCG. Con estos resultados, tomando como referencia estándar la muestra de FCG, la saliva mostró una sensibilidad baja, del 22%, y una especificidad del 100%. Otros autores, mediante PCR en tiempo real, al comparar la frecuencia de detección de esta bacteria en muestra subgingival y en lavado bucal, y tomando como referencia la muestra subgingival, obtuvieron una sensibilidad mayor a la encontrada por nosotros, del 93.8% y una especificidad menor, del 75% (Boutaga et al., 2007). Umeda et al. (Umeda et al., 1998b) encontraron una concordancia estadísticamente significativa entre ambas estrategias de toma de muestras para su detección (siendo mayor en saliva), con un grado de concordancia moderado ( $\kappa=0.59$ ). Haririan et al. (Haririan et al., 2014) también hallaron mediante PCR un grado de concordancia moderado ( $\kappa=0.64$ ), y una sensibilidad y especificidad del 90.74% y del 72.73%, respectivamente.

Para *T. forsythia*, no se observó concordancia estadísticamente significativa entre ambas estrategias de toma de muestras, siendo el grado de concordancia muy bajo ( $\kappa=0.171$ ). En saliva aparecieron 6 falsos negativos y 11 falsos positivos. La sensibilidad de la saliva para *T. forsythia*, tomando como referencia estándar la muestra

en FCG, fue del 81% y la especificidad del 35%. Aunque algunos autores, mediante PCR, han expuesto que la saliva o el lavado bucal es una muestra adecuada para la detección de dicha bacteria (Umeda et al., 1998b; Boutaga et al., 2007), otros como Mager et al. (Mager et al., 2003), mediante técnica de ADN-ADN en tablero de ajedrez, han sugerido que la muestra de FCG es superior a la muestra de saliva, no recomendando la saliva para el estudio de *T. forsythia*. Haririan et al. (Haririan et al., 2014), mediante PCR y tecnología de *microarrays*, encuentran un grado de concordancia bajo entre ambas estrategias de toma de muestras ( $\kappa=0.38$ ) y una sensibilidad del 96% y especificidad del 100%.

La concordancia entre la muestra de FCG y saliva para la detección de *T. denticola* fue estadísticamente significativa, con un grado de concordancia moderado ( $\kappa=0.404$ ). De los 20 pacientes positivos a *T. denticola* en FCG, 18 lo fueron también en saliva, hallándose 2 falsos negativos. Sin embargo, de los 28 sujetos negativos en FCG, solo 15 lo fueron en saliva, apareciendo 13 falsos positivos. La sensibilidad de la muestra en saliva, tomando como referencia la muestra en FCG, para detectar *T. denticola* fue del 90% y la especificidad del 54%. Otros autores también observaron una concordancia moderada entre ambas estrategias, mediante PCR (Umeda et al., 1998b), o con técnica de ADN-ADN en tablero de ajedrez (Mager et al., 2003). Haririan et al. (Haririan et al., 2014) encontraron una concordancia baja entre la muestra de saliva y FCG, y una sensibilidad del 94.67% y especificidad del 100%.

### **3. ASOCIACIÓN ENTRE PARÁMETROS CLÍNICOS Y MICROBIOLÓGICOS EN FCG Y EN SALIVA**

Para determinar la utilidad diagnóstica de la muestra de FCG y de saliva, se examinó si existía alguna asociación entre las características clínicas (índice de placa, profundidad de sondaje, nivel de inserción y sangrado al sondaje) evaluadas en los pacientes del grupo con periodontitis y los controles sanos (teniendo en cuenta si eran positivos o negativos a cada uno de los microorganismos) y los resultados microbiológicos que fueron obtenidos con mediante PCR en tiempo real para CMV y VEB y con PCR convencional para las bacterias.



Al no hallarse CMV en ninguna muestra de FCG y saliva, no pudo realizarse ninguna asociación con las variables clínicas. Respecto al VEB, en el análisis del árbol de clasificación, se observó que la medida que segmentaba significativamente al VEB en muestra de FCG era el índice de placa. La detección de VEB en saliva no se asoció de forma estadísticamente significativa con ninguno de los parámetros clínicos evaluados.

En FCG, la presencia de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola* se asoció estadísticamente con el índice de placa, la profundidad de sondaje, el nivel de inserción y el sangrado al sondaje. Sin embargo, *A. actinomycetemcomitans* no se relacionó con ninguna de las cuatro variables clínicas analizadas.

En saliva, solo *P. gingivalis* y *T. denticola* se asociaron con el índice de placa, la profundidad de sondaje y el nivel clínico de inserción y el sangrado al sondaje. Sin embargo, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* y *T. forsythia* no se relacionaron con ninguna de las variables evaluadas.

## ÍNDICE DE PLACA

No se halló en ninguna muestra de FCG o saliva ADN de CMV, por lo que no se pudo establecer relación con el índice de placa. Otros autores tampoco observaron relación entre la presencia de dicho patógeno a nivel subgingival con el índice de placa en sujetos con periodontitis crónica y agresiva (Saygun et al., 2002; Kubar et al., 2004; Botero et al., 2007). Sin embargo, Ling et al. (Ling et al., 2004) encontraron mayor presencia de CMV en FCG cuando el índice de placa era bajo.

Se detectó solo 1 muestra positiva para VEB en FCG y 8 en saliva, no existiendo asociación estadísticamente significativa con el índice de placa, según el test de Mann-Whitney y el test *t*-Student. Hay que señalar que, aunque son escasos los estudios en los que se ha evaluado dicho índice, otros autores tampoco obtuvieron ninguna asociación al intentar correlacionar la presencia de este virus en FCG con el índice de placa (Saygun et al., 2002). Sin embargo, en el análisis del árbol de clasificación (análisis CHAID), la única medida que segmentaba significativamente a VEB en muestra de FCG era el índice de placa, de forma que, si el porcentaje era menor o igual a 5.35, aumentaba la probabilidad de presencia de dicho virus, mientras que si el porcentaje era mayor a 5.35, disminuía la probabilidad de su detección. Aunque no se ha encontrado

una explicación cierta sobre este hecho, se ha sugerido que el subtipo VEB-2 está asociado a un índice de placa alto (puntuaciones 2 y 3, según el índice de placa de Silness y Løe) y el VEB-1 a un índice de placa bajo (0 y 1, según el índice de placa de Silness y Løe) (Klemenc et al., 2005).

De las cinco bacterias periodontopatógenas evaluadas en el estudio en muestra de FCG, se observó asociación estadísticamente significativa con el índice de placa para *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola*, no encontrando relación con la presencia de *A. actinomycetemcomitans*. En saliva, dicho índice solo mostró asociación estadísticamente significativa con dos de las cinco bacterias evaluadas, *P. gingivalis* y *T. denticola*. Estos resultados podrían confirmar que el desarrollo de la microflora subgingival depende más de la placa supragingival que de la presencia de estas bacterias en saliva (Slots y Gibbons, 1978).

## PROFUNDIDAD DE SONDAJE Y NIVEL CLÍNICO DE INSERCIÓN

En nuestro estudio, no pudo relacionarse la detección de CMV con los parámetros clínicos de profundidad de sondaje y nivel clínico de inserción. Otros autores, tampoco encontraron asociación con ninguna de las dos variables (Ling et al., 2004). Sin embargo, en algunos estudios sí se ha observado asociación estadísticamente significativa entre la presencia de dicho virus en FCG y la profundidad de sondaje (Contreras y Slots, 1996; Contreras et al., 1999a; Saygun et al., 2002; Slots et al., 2002; Kubar et al., 2004; Kubar et al., 2005; Botero et al., 2007; Grenier et al., 2009) y el nivel clínico de inserción (Saygun et al., 2002; Kubar et al., 2004; Kubar et al., 2005; Botero et al., 2007). Contreras y Slots (Contreras y Slots, 1996) encontraron mayor frecuencia de detección de CMV en bolsas profundas (7-9 mm) en relación a bolsas moderadas (3-5 mm).

Respecto al VEB, no se obtuvo ninguna asociación entre la profundidad de sondaje y el nivel clínico de inserción y su detección en FCG o saliva. Otros estudios sí han hallado relación entre la presencia de dicho patógeno en FCG y estos dos parámetros clínicos (Contreras y Slots, 1996; Contreras et al., 1999a; Ling et al., 2004; Kubar et al., 2005; Dawson et al., 2009b; Kato et al., 2013). Así, Contreras et al. (Contreras et al., 1999a) observaron una relación positiva entre el hallazgo de VEB en sujetos con periodontitis crónica y la profundidad de sondaje (OR de 1.77). Ling et al. (Ling et al., 2004) y Kato

et al. (Kato et al., 2013) encontraron mayor frecuencia de detección de VEB en bolsas profundas que en superficiales. Sin embargo, otros estudios corroboran nuestro resultado, no hallando asociación con la profundidad de sondaje (Konstantinidis et al., 2005; Grenier et al., 2009). En muestra de saliva, otros autores tampoco observaron relación entre la profundidad de sondaje y el nivel clínico de inserción y la presencia de dicho patógeno (Dawson et al., 2009b; Saygun et al., 2011).

Respecto a las bacterias evaluadas en nuestro estudio, en FCG se halló asociación estadísticamente significativa entre la presencia de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola* y los parámetros clínicos de profundidad de sondaje y nivel clínico de inserción. Se ha observado que la profundidad de sondaje tiene un efecto significativo en la presencia de las bacterias del complejo “rojo”, *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola* (Takeuchi et al., 2001; van Winkelhoff et al., 2002; Hamlet et al., 2004; Kawada et al., 2004; Haffajee et al., 2006b; Iniesta, 2007; Mineoka et al., 2008; Morikawa et al., 2008; Faveri et al., 2009; Griffen et al., 2012; Tomita et al., 2013; Loozen et al., 2014) y también sobre *P. intermedia* (van Winkelhoff et al., 2002; Griffen et al., 2012; Loozen et al., 2014).

Sin embargo, en este estudio, no se obtuvo ninguna asociación con la presencia de *A. actinomycetemcomitans* (debido probablemente a la baja detección de este patógeno). Otros autores observaron una relación negativa entre la detección de esta bacteria y el aumento de profundidad de sondaje (Hamlet et al., 2001; Faveri et al., 2009; Loozen et al., 2014).

En saliva, la detección de *P. gingivalis* y *T. denticola* se relacionó con la profundidad de sondaje y el nivel clínico de inserción. *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* y *T. forsythia* no se asociaron con estas dos variables. Sin embargo, Umeda et al. (Umeda et al., 1998b) hallaron asociación entre la profundidad de sondaje y la presencia de estos cinco patógenos en saliva. Resultados similares obtenidos a los nuestros han sido reportados por Paju et al. (Paju et al., 2009) y por Salminen et al. (Salminen et al., 2014), los cuales también hallaron relación entre la presencia de *P. gingivalis* en saliva y una profundidad de sondaje mayor o igual a 6 mm. Sin embargo, Paju et al. (Paju et al., 2009) no observaron relación entre dicho parámetro y la detección en saliva de *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *T. denticola* y *T. forsythia*. Respecto a *T. denticola*, en otros trabajos también se ha encontrado asociación con la profundidad de

sondaje en aquellos sujetos positivos a dicho patógeno en saliva (Martínez-Pabón et al., 2008; Haririan et al., 2014). Haririan et al. (Haririan et al., 2014) también hallaron relación con la profundidad de sondaje y la presencia de *T. forsythia* en saliva.

### SANGRADO AL SONDAJE

En nuestro estudio, el sangrado al sondaje no pudo relacionarse con el CMV, al no detectarse ni en FCG ni en muestra de saliva. Otros autores no encontraron diferencias en el sangrado al sondaje entre los pacientes positivos y negativos al CMV en FCG (Kubar et al., 2004; Ling et al., 2004; Botero et al., 2007).

En relación al VEB, el sangrado al sondaje no mostró ninguna asociación estadísticamente significativa con su detección en FCG o saliva. En otros estudios, que evaluaron la inflamación de los tejidos periodontales mediante el índice gingival, tampoco encontraron relación con el hallazgo de VEB en FCG (Saygun et al., 2002; Klemenc et al., 2005). Por el contrario, Dawson et al. (Dawson et al., 2009a) observaron mayor sangrado al sondaje en pacientes positivos al VEB, aunque no pudieron relacionarlo con la carga vírica. Respecto a la presencia de VEB en muestra de saliva y su relación con el sangrado al sondaje, los resultados de los estudios son controvertidos. Mientras Idesawa et al. (Idesawa et al., 2004) encontraron relación entre el hallazgo de dicho patógeno y valores altos de sangrado al sondaje, Dawson et al. (Dawson et al., 2009b) no hallaron asociación.

Respecto a las bacterias analizadas en este estudio en FCG, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola* estaban asociadas de manera estadísticamente significativa con el sangrado al sondaje. Otros estudios también confirman estos resultados (Yano-Higuchi et al., 2000; Komiya et al., 2000; Slots et al., 2003; Mineoka et al., 2008; Morikawa et al., 2008). Se ha observado que las especies que forman el complejo “rojo” (*P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola*) presentaban una fuerte asociación con el sangrado al sondaje (Socransky et al., 1998).

Sin embargo, la presencia de *A. actinomycetemcomitans* en FCG no pudo relacionarse de forma estadísticamente significativa con el sangrado al sondaje. Otros estudios tampoco han podido encontrar relación entre la detección de *A. actinomycetemcomitans* y dicho parámetro (Albandar et al., 1990; Komiya et al., 2000; Iniesta, 2007).

En saliva, se observó asociación estadísticamente significativa entre *P. gingivalis* y *T. denticola* y el sangrado al sondaje, no encontrando relación con *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* y *T. forsythia*. Sin embargo, otros autores no encontraron relación entre la presencia en saliva de *P. gingivalis* (Salminen et al., 2014) o *T. denticola* (Haririan et al., 2014) y el sangrado al sondaje.

## **4. ASOCIACIÓN ENTRE PATÓGENOS**

### **4.1. Asociación entre CMV Y VEB**

Se ha sugerido que la coinfección VEB-CMV podría estar relacionada con la severidad y extensión de la enfermedad periodontal. Sin embargo, en este estudio, al no detectarse ADN de CMV en la cohorte de sujetos con periodontitis ni en los controles sanos, no pudo comprobarse dicha asociación. Otros autores tampoco han observado relación sinérgica entre ambos virus (Michalowicz et al., 2000; Slots et al., 2002; Slots et al., 2003).

Sin embargo, en un estudio realizado en Grecia, en pacientes con periodontitis de aparición temprana en fase de mantenimiento, observaron que la coinfección por ambos virus (43.8%) estaba asociada a aquellas localizaciones con sangrado al sondaje y con un ritmo de progresión más rápido que aquellas en las que únicamente se aislaba uno de los dos virus (Kamma et al., 2001). Otros autores, en periodontitis agresiva, también encontraron coinfección VEB-1 y CMV (Ting et al., 2000; Yapar et al., 2003; Imbronito et al., 2008b). En periodontitis crónica, Contreras y Slots (Contreras y Slots, 1996) detectaron asociación entre estos dos virus en el 44% de bolsas profundas y solo en el 11% de las bolsas superficiales, siendo más frecuente en estas últimas la ausencia de virus o la monoinfección por uno ellos.

Aunque no hay una explicación cierta sobre este hecho, se ha propuesto que podría deberse a una coinfección concurrente de ambos virus (Stevens et al., 2001) o una reactivación del VEB latente en los linfocitos B, debida probablemente a una alteración transitoria de la inmunidad celular por el CMV, situación que se ha demostrado en estudios *in vitro* (Arcenas y Widen, 2002) e *in vivo* (Aalto et al., 1998). Una tercera causa, podría ser un falso positivo para cualquiera de los dos virus.

También se han descrito asociaciones del VEB y del CMV con otros virus, como el VHS-1 en periodontitis crónica (Contreras y Slots, 1996; Contreras et al., 1999a; Bilichodmath et al., 2009) y agresiva (Kamma et al., 2001; Slots et al., 2003; Imbronito et al., 2008b; Ling et al., 2004; Bilichodmath et al., 2009), y del VEB y el VHH-7 en biopsias gingivales de lesiones con periodontitis crónica y agresiva (Rotola et al., 2008).

#### 4.2. Asociación entre CMV, VEB y bacterias periodontopatógenas

No se observó asociación estadísticamente significativa entre la presencia del VEB en FCG o saliva con ninguna de las cinco bacterias evaluadas. Al no detectarse CMV en FCG ni en saliva, no pudo establecerse asociación. Sin embargo, en sujetos con periodontitis crónica, Contreras et al. (Contreras et al., 1999a) observaron relación entre CMV y *P. gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *T. forsythia* y *T. denticola* y entre VEB-1 y *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* y *T. denticola*.

Los estudios realizados en periodontitis agresiva muestran mayor relación virus-bacterias. En este sentido, Michalowicz et al. (Michalowicz et al., 2000), en un estudio realizado en adolescentes jamaicanos con periodontitis juvenil, hallaron una OR de 6.6 y 8.7, para CMV y *P. gingivalis*, respectivamente, incrementándose a una OR de 51.4 cuando ambos patógenos estaban presentes, lo cual podría indicar una actuación sinérgica entre CMV y *P. gingivalis* e influir en la severidad de la enfermedad. También observaron que cuando este virus estaba presente, la OR de detectar *A. actinomycetemcomitans* aumentaba 31.8 veces. Ting et al. (Ting et al., 2000), en periodontitis juvenil localizada, detectaron más frecuentemente *A. actinomycetemcomitans* en aquellas localizaciones con CMV en estado activo que en aquellas en las que se encontraba en estado latente. Sin embargo, Botero et al. (Botero et al., 2007) hallaron una baja frecuencia de detección de *A. actinomycetemcomitans* asociado a CMV en sujetos con periodontitis crónica y en sanos y ninguna asociación en periodontitis agresiva.

En Grecia, Kamma et al. (Kamma et al., 2001), en sujetos con periodontitis de aparición temprana, encontraron que aquellas localizaciones con coinfección entre HSV, CMV y VEB-1 estaban asociadas a mayor presencia de *P. gingivalis* y *Dialister pneumosintes*.

que aquellas en las que no se detectaban estos virus. Estudios posteriores de este grupo hallaron asociación entre CMV y *D. pneumosintes* en aquellas localizaciones con mayor pérdida ósea (Slots et al., 2003).

Saygun et al. (Saygun et al., 2004a), mediante PCR convencional, en periodontitis agresiva, observaron una asociación significativa entre CMV y *P. gingivalis* y entre VEB-1 y *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *C. rectus*. Unos años después, estos mismos autores encontraron mediante PCR en tiempo real, asociación entre CMV y *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *C. rectus* y entre VEB y *P. gingivalis* y *T. forsythia* (Saygun et al., 2008).

Aunque no es un hecho claro, se han propuesto diferentes mecanismos por los que los herpesvirus podrían interaccionar con las bacterias periodontopatógenas o facilitar su sobrecrecimiento. En primer lugar, la infección de las células del epitelio oral por estos virus favorecería la ruptura de la barrera epitelial, permitiendo la invasión de las bacterias a los tejidos profundos del periodonto (Contreras y Slots, 2000a; Contreras et al., 2014). En segundo lugar, se ha descrito que las células infectadas por estos virus podrían expresar ciertas proteínas en su superficie, facilitando la unión de las bacterias (Bakaletz, 1995). Así, en un estudio *in vitro* se observó que ciertas cepas de *A. actinomycetemcomitans* presenban mayor capacidad de adherencia a las células epiteliales infectadas por CMV que a las no infectadas (Teughels et al., 2007). Por último, se ha expuesto que las reactivaciones de estos virus, darían lugar a una alteración en el sistema inmune, facilitando el sobrecrecimiento bacteriano, lo cual, a su vez, reactivaría a otros virus en estado latente, hecho que se ha observado entre VEB y *P. gingivalis* (Sugano et al., 2004). Se ha descrito que el ácido butírico, metabolito de *P. gingivalis*, puede inducir la transcripción de ZEBRA, proteína relacionada con la reactivación del VEB (Imai et al., 2012).

#### **4.3. Asociación entre bacterias periodontopatógenas**

Con respecto a las asociaciones entre las bacterias evaluadas, en FCG, no se halló asociación estadísticamente significativa entre *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola*. Otros autores también han observado que no es frecuente detectar en la misma localización *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* (Ali et al., 1992; Riggio et al., 1996; Socransky et al., 1988; Iniesta, 2007; Loozen et al., 2014). Sin embargo, Yoshida et al. (Yoshida et

al., 2003) encontraron mayor frecuencia de detección de *A. actinomycetemcomitans* serotipo “c” en las localizaciones positivas a *P. gingivalis*, en comparación con los serotipos “a”, “b”, “d” y “e”. En este sentido, se ha identificado un antígeno específico (SPA) en las cepas del serotipo “c” que podría participar en la coagregación con *P. gingivalis* (Suzuki et al., 2006).

En el presente estudio, en FCG, se observó que *P. gingivalis* presentaba una asociación estadísticamente significativa con *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola*, con una OR de 7.36, 2.64 y 8.28, respectivamente. Se ha sugerido que *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola* eran tres especies que formaban una comunidad fuertemente asociada entre sí, el complejo “rojo” (Socransky et al., 1998). *P. intermedia*, en FCG mostró asociación estadísticamente significativa con *T. forsythia* y con *T. denticola*, con una OR de 2.02 y de 9.44, respectivamente.

La asociación más fuerte en FCG se halló entre *T. forsythia* y *T. denticola*, con una OR de 10.41. Estudios previos han mostrado la coagregación entre *T. forsythia* y *T. denticola* (Ikegami et al., 2004; Holt y Ebersole, 2005; Loozen et al., 2014) y entre *P. gingivalis* y *T. denticola* (Onagawa et al., 1994). Posiblemente, *T. denticola* haga de nexo de unión entre *P. gingivalis* y *T. forsythia*, quedando manifestado *in vivo* como una coexistencia entre estas dos últimas especies. Se ha observado *in vitro* que la unión entre *P. gingivalis* y *T. forsythia* es unimodal (interacción proteína-proteína), por tanto, muy débil (Yao et al., 1996). Sin embargo, la unión entre *P. gingivalis* y *T. denticola* es bimodal (interacción entre proteínas y entre moléculas no proteicas en ambas bacterias (Umemoto et al., 1997; Umemoto et al., 1999; Ikegami et al., 2004; Yamada et al., 2005; Iniesta, 2007).

En saliva, solo se observó asociación estadísticamente significativa entre *P. gingivalis* y *T. denticola*, con una OR de 1.56 y entre *T. forsythia* y *T. denticola*, con una OR de 3.11. Probablemente, las asociaciones que puedan encontrarse en la saliva sean diferentes o más débiles que en el biofilm subgingival, ya que las condiciones de crecimiento para cada una de las bacterias en este medio son distintas a las que puedan tener lugar en la bolsa periodontal (de Jong y van der Hoeven, 1987; Periasamy y Kolenbrander, 2009; Kolenbrander, 2011). Además, ciertos componentes de la saliva, como enzimas, algunas proteasas o inmunoglobulinas, pueden influenciar en las interacciones entre las bacterias (Scannapieco, 1994; Skopek y Liljemark, 1994).





# **VIII. CONCLUSIONES**

---



1. La prevalencia encontrada de ADN de CMV y VEB en nuestra población de estudio, mediante PCR en tiempo real, es baja. No se ha detectado ADN de CMV en ningún sujeto, tanto en muestras de FCG como en saliva. Respecto al VEB, no se han observado diferencias estadísticamente significativas en frecuencia de detección entre el grupo periodontitis crónica (FCG: 0%; saliva: 12.5%) y el grupo control (FCG: 4.2%; saliva: 20.8%).
2. No se han observado asociaciones entre CMV y VEB, y entre estos dos virus con las bacterias periodontopatógenas analizadas. Sin embargo, en FCG todas las bacterias están relacionadas entre sí, a excepción de *A. actinomycetemcomitans*. En saliva, únicamente *T. denticola* está asociada con *P. gingivalis* y *T. denticola*.
3. En FCG, la presencia de VEB se relaciona con un índice de placa bajo, mientras que la detección de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *T. denticola* se asocia con mayores valores de índice de placa, profundidad de sondaje, nivel clínico de inserción y sangrado al sondaje. En saliva, solo *P. gingivalis* y *T. denticola* se relacionan con los parámetros clínicos estudiados.
4. La concordancia entre la muestra de FCG y saliva para la detección de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* es alta; moderada para *T. denticola*; baja para *P. intermedia*, y muy baja para VEB y *T. forsythia*. Por tanto, mediante PCR, la saliva podría emplearse como un método diagnóstico alternativo a la toma de muestra de FCG para la detección de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. denticola*, no aconsejándose para la determinación de VEB, *P. intermedia* y *T. forsythia*.
5. Los resultados del presente trabajo no confirman el modelo patogénico propuesto de los herpesvirus en periodontitis, ya que la prevalencia de CMV y VEB, en FCG y saliva, es baja y no se asocian con los parámetros clínicos de enfermedad. Por ello, consideramos que, para obtener una conclusión definitiva, es necesario que se desarrollen estudios prospectivos, con un número suficiente de sujetos y, fundamentalmente, se determinen diferentes marcadores de infección por estos virus y se relacionen con las variables clínicas de enfermedad periodontal.



## **IX. REFERENCIAS**



- Aalto, S.M., Linnavuori, K., Peltola, H., Vuori, E., Weissbrich, B., Schubert, J., Hedman, L., Hedman, K. (1998). Immunoreactivation of Epstein-Barr virus due to cytomegalovirus primary infection. *Journal of Medical Virology*, 56(3), 186-191.
- AAP. (1996). Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Annals of Periodontology*, 1(1), 926-932.
- Åberg, C.H., Kwamin, F., Claesson, R., Johansson, A., Haubek, D. (2012). Presence of JP2 and non-JP2 genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and attachment loss in adolescents in Ghana. *Journal of Periodontology*, 83(12), 1520-1528.
- Ah, M.K., Johnson, G.K., Kaldahl, W.B., Patil, K.D., Kalkwarf, K.L. (1994). The effect of smoking on the response to periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology*, 21(2), 91-97.
- Al Zahrani, M.S., Bissada, N.F., Borawski, E.A. (2003). Obesity and periodontal disease in young, middle-aged, and older adults. *Journal of Periodontology*, 74(5), 610-615.
- Albandar, J.M., Olsen, I., Gjermo, P. (1990). Associations between six DNA probe-detected periodontal bacteria and alveolar bone loss and other clinical signs of periodontitis. *Acta Odontologica Scandinavica*, 48(6), 415-423.
- Albandar, J.M., Rams, T.E. (2002). Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontology 2000*, 29, 7-10.
- Alfieri, C., Birkenbach, M., Kieff, E. (1991). Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology*, 181(2), 595-608.
- Ali, R.W., Lie, T., Skaug, N. (1992). Early effects of periodontal therapy on the detection frequency of four putative periodontal pathogens in adults. *Journal of Periodontology*, 63(6), 540-547.
- Amaliya, A., Laine, M.L., Delanghe, J.R., Loos, B.G., Van Wijk, A.J., Van der Velden, R. (2015). Java project on periodontal diseases: periodontal bone loss in relation to environmental and systemic conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(4), 325-332.
- Amaral Cda, S., Vettore, M.V., Leão, A. (2009). The relationship of alcohol dependence and alcohol consumption with periodontitis: a systematic review. *Journal of Dentistry*, 37(9), 643-651.
- Amicosante, M., Richeldi, L., Trenti, G., Paone, G., Campa, M., Bisetti, A., Saltini, C. (1995). Inactivation of polymerase inhibitors for *Mycobacterium tuberculosis* DNA amplification in sputum by using capture resin. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(3), 629-630.
- Apatzidou, D.A., Riggio, M.P., Kinane, D.F. (2005). Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adults patients with periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(9), 973-983.
- Arcenas, R., Widen, R.H. (2002). Epstein-Barr virus reactivation after superinfection of the BJAB-B1 and P3HR-1 cell lines with cytomegalovirus. *BMC Microbiology*, 2, 20.



- Armitage, G.C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*, 4(1), 1-6.
- Asikainen, S., Alaluusua, S., Saxén, L. (1991). Recovery of *A. actinomycetemcomitans* from teeth, tongue, and saliva. *Journal of Periodontology*, 62(3), 203-206.
- Astolfi, C.M., Shinohara, A.L., da Silva, R.A., Santos, M.C., Line, S.R., de Souza, A.P. (2006). Genetic polymorphisms in the MMP-1 and MMP-3 gene may contribute to chronic periodontitis in a Brazilian population. *Journal of Clinical Periodontology*, 33(10), 699-703.
- Babcock, G.J., Decker, L.L., Freeman, R.B., Thorley-Lawson, D.A. (1999). Epstein-Barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblast, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(4), 567-576.
- Baelum, V., Fejerskov, O., Manji, F. (1988). Periodontal diseases in adult Kenyans. *Journal of Clinical Periodontology*, 15(7), 445-452.
- Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Séguin, C., et al. (1984). DNA sequence and expression of the b95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 310(5974), 207-211.
- Bailey, M.T., Kinsey, S.G., Padgett, D.A., Sheridan, J.F., Leblebicioglu, B. (2009). Social stress enhances IL-1beta and TNF-alpha production by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated CD11b+ cells. *Physiology & Behavior*, 98(3), 351-358.
- Bakaletz, L.O. (1995). Viral potentiation of bacterial superinfection of the respiratory tract. *Trends in Microbiology*, 3(3), 110-114.
- Beikler, T., Abdeen, G., Schnitzer, S., Sälzer, S., Ehmke, B., Heinecke, A., Flemmig, T.F. (2004). Microbiological shifts in intra- and extraoral habitats following mechanical periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(9), 777-783.
- Belstrøm, D., Fiehn, N.E., Nielsen, C., Kirby, K., Twetman, S., Klepac-Ceraj, V., Paster, B.J., Holmstrup, P. (2014). Differences in bacterial saliva profile between periodontitis and a control cohort. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(2), 104-112.
- Bergallo, M., Costa, C., Terlizzi, M.E., Margio, S., Sidoti, F., Sinesi, F., Cavallo, R. (2008). Evaluation of two sets of primers for detection of immediate early gene UL123 of human cytomegalovirus (HCMV). *Molecular Biotechnology*, 38(1), 65-70.
- Berglundh, T., Lijenberg, B., Tarkowski, A., Lindhe, J. (2002). The presence of local and circulating autoreactive B cells in patients with advanced periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(4), 281-286.
- Berglundh, T., Donati, M. (2005). Aspects of adaptive host response in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(Suppl 6), 87-107.
- Bergström, J., Eliasson, S. (1987). Noxious effect of cigarette smoking on periodontal health. *Journal of Periodontal Research*, 22(6), 513-517.

- Bergström, J. (1989). Cigarette smoking as a risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dental Oral Epidemiology*, 17(5), 245-247.
- Bergström, J., Eliasson, S., Preber, H. (1991). Cigarette smoking and periodontal bone loss. *Journal of Periodontology*, 62(4), 242-246.
- Bergström, J., Preber H. (1994). Tobacco use as a risk factor. *Journal of Periodontology*, 65(5), 545-550.
- Bilder, L., Elimelech, R., Szwarcwort-Cohen, M., Kra-Oz, Z., Machtei, E.E. (2013). The prevalence of human herpesviruses in saliva of chronic periodontitis patients compared to oral health providers and healthy controls. *Archives of Virology*, 158(6), 1221-1226.
- Bilichodmath, S., Mangalekar, S.B., Sharma, D.C., Prabhakar, A.K., Reddy, S.B., Kalburgi, N.B., Patil, S.R., Bhat, K. (2009). Herpesviruses in chronic and aggressive periodontitis patients in an Indian population. *Journal of Oral Science*, 51(1), 79-86.
- Boppana, S.B., Ross, S.A., Novak, Z., Shimamura, M., Tolan, R.W.Jr., Palmer, A.L., Ahmed, A., Michaels, M.G., Sánchez, P.J., Bernstein, D.I., Britt, W.J., Fowler, K.B., National Institute on Deafness and Other Communication Disorders CMV and Hearing Multicenter Screening (CHIMES) Study. (2010). Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. *Journal of the American Medical Association*, 303(14), 1375-1382.
- Boppana, S.B., Ross, S.A., Shimamura, M., Palmer, A.L., Ahmed, A., Michaels, M.J., Sánchez, P.J., Bernstein, D., Tolan, R.W.Jr., Novak, Z., Chawdhury, N., Britt, W.J., Fowler, K.B., National Institute on Deafness and Other Communication Disorders CHIMES Study. (2011). Saliva polymerase chain reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *The New England Journal of Medicine*, 364(22), 2111-2118.
- Borrel, L.N., Papapanou, P.N. (2005). Analytical epidemiology of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(Suppl 6), 132-158.
- Botero, J.E., Parra, B., Jaramillo, A., Contreras, A. (2007). Subgingival human cytomegalovirus correlates with increased clinical periodontal parameters and bacterial coinfection in periodontitis. *Journal of Periodontology*, 78(12), 2303-2310.
- Botero, J.E., Contreras, A., Parra, B. (2008a). Effects of cytomegalovirus infection on the mRNA expression of collagens and matrix metalloproteinases in gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research*, 43(6), 649-657.
- Botero, J.E., Contreras, A., Parra, B. (2008b). Profiling of inflammatory cytokines produced by gingival fibroblasts after human cytomegalovirus infection. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(4), 291-298.
- Botero, J.E., Vidal, C., Contreras, A., Parra, B. (2008c). Comparison of nested polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR and viral culture for the detection of cytomegalovirus in subgingival samples. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(3), 239-244.

- Boutaga, K., Savelkoul, P.H.M., Winkel, E.G., van Winkelhoff, A.J. (2007). Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Periodontology*, 78(1), 79-86.
- Bravo Pérez, M., Casals-Pedró, E., Cortés Mantnicorena, F., Llodra Calvo, J.C. (2006). Encuesta de salud oral en España 2005. *Revista del Ilustre Consejo General de Colegios de Odontólogos y Estomatólogos de España*, 11, 409-456.
- Brecht, K.F., Goelz, R., Bevot, A., Krägeloh-Mann, I., Wilke, M., Lidzba, K. (2015). Postnatal human cytomegalovirus infection on preterm infants has long-term neuropsychological sequelae. *The Journal of Pediatrics*, 166(4), 834-839.
- Brunsvold, M.A. (2005). Pathologic tooth migration. *Journal of Periodontology*, 76(6), 859-866.
- Cannon, M.J., Schmid, D.S., Hyde, T.B. (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in Medical Virology*, 20(4), 202-213.
- Casas, A., Herrera, D., Martín-Carnes, J., González, I., O'Connor, A., Sanz, M. (2007). Influence of sampling strategy on microbiologic results before and after periodontal treatment. *Journal of Periodontology*, 78(6), 1103-1112.
- Cassai, E., Galvan, M., Trombelli, L., Rotola, A. (2003). HHV-6, HHV-7, HHV-8 in gingival biopsies from chronic adult periodontitis patients. A case-control study. *Journal of Clinical Periodontology*, 30(3), 184-191.
- Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., van Dyke, T.E. (2014). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 64(1), 57-80.
- Chalabi, M., Moghim, S., Mogharehabet, A., Najafi, F., Rezaie, F. (2008). EBV and CMV in chronic periodontitis: a prevalence study. *Archives of Virology*, 153(10), 1917-1919.
- Chalabi, M., Rezaie, F., Moghim, S., Mogharehabet, A., Rezaei, M., Mehraban, B. (2010). Periodontopathic bacteria and herpesviruses in chronic periodontitis. *Molecular Oral Microbiology*, 25(3), 236-240.
- Chang, C.M., Yu, K.J., Mbulaiteye, S.M., Hildesheim, A., Bhatia, K. (2009). The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus Research*, 143(2), 209-221.
- Chapple, I.L., Genco, R. (2013). Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(Suppl 14), S107-112.
- Chen, L.L., Li, H., Zhang, P.P., Wang, S.M. (2012). Association between vitamin D receptor polymorphisms and periodontitis: a meta-analysis. *Journal of Periodontology*, 83(9), 1095-1103.
- Cheung, A., Kieff, E. (1982). Long internal direct repeat in Epstein-Barr virus DNA. *Journal of Virology*, 44(1), 286-294.
- Compton, T., Nowlin, D.M., Cooper, N.R. (1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology*, 193(2), 834-841.

- Contreras, A., Slots, J. (1996). Mammalian viruses in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 11(6), 381-386.
- Contreras, A., Falkler, W.A.Jr., Enwonwu, C.O., Idigbe, E.O., Savage, K.O., Afolabi, M.B., Onwujedwe, D., Rams, T.E., Slots, J. (1997). Human Herpesviridae in acute necrotizing ulcerative gingivitis in children in Nigeria. *Oral Microbiology and Immunology*, 12(5), 259-265.
- Contreras, A., Umeda, M., Chen, C., Bakker, I., Morrison, J.L., Slots, J. (1999a). Relationship between herpesviruses and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. *Journal of Periodontology*, 70(5), 478-484.
- Contreras, A., Zadeh, H.H., Nowzari, H., Slots, J. (1999b). Herpesvirus infection of inflammatory cells in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 14(4), 206-212.
- Contreras, A., Nowzari, H., Slots, J. (2000a). Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiology and Immunology*, 15(1), 15-18.
- Contreras, A., Slots, J. (2000b). Herpesvirus in human periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 35(1), 3-16.
- Contreras, A., Mardirossian, A., Slots, J. (2001). Herpesviruses in HIV-periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(1), 96-102.
- Contreras, A., Botero, J.E., Slots, J. (2014). Biology and pathogenesis of cytomegalovirus in periodontal disease. *Periodontology 2000*, 64(1), 40-56.
- Cookson, A.L., Wray, A., Handley, P.S., Jacob, A.E. (1996). An investigation into the use of SDS-PAGE of cell surface extracts and proteolytic activity to differentiate *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia*. *FEMS Microbiology Letters*, 136(2), 109-115.
- Cortelli, S.C., Feres, M., Rodrigues, A.A., Aquino, D.R., Shibli, J.A., Cortelli, J.R. (2005). Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in unstimulated saliva of patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*, 76(2), 204-209.
- Costa, P.P., Trevisan, G.L., Macedo, G.O., Palioto, D.B., Souza, S.L., Grisi, M.F., Novaes, A.B.Jr., Taba, M.Jr. (2010). Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. *Journal of Periodontology*, 81(3), 384-391.
- Cour, M.I., Giménez, A., Martínez, J.A., González-Cuadrado, S., González-Gómez, C., Martín, C.F., Fernández, M.E., Arroyo, R. (1991). Prevalence of the Epstein-Barr virus among different populations in the central area. *Anales de Medicina Interna*, 8(11), 529-532.
- Crockett, A.O., Wittwer, C.T. (2001). Fluorescein-labeled oligonucleotides for real-time PCR: using the inherent quenching of deoxyguanosine nucleotides. *Analytical Biochemistry*, 290(1), 89-97.
- Crough, T., Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 76-98.
- Dahlén, G., Renvert, S., Wikström, M., Egelberg, J. (1990). Reproducibility of microbiological samples from periodontal pockets. *Journal of Clinical Periodontology*, 17(2), 73-77.

- Dalla Vecchia, C.F., Susin, C., Rosing, C.K., Oppermann, R.V., Albandar, J.M. (2005). Overweight and obesity as risk indicators for periodontitis in adults. *Journal of Periodontology*, 76(10), 1721-1728.
- Danser, M.M., van Wilkelhoff, A.J., de Graaf, J., Loos, B.G., van der Velden, U. (1994). Short-term effect of full-mouth extraction on periodontal pathogens colonizing the oral mucous membrane. *Journal of Clinical Periodontology*, 21(7), 484-489.
- Daraut, I., Albandar, J., Skaug, N., Ali, R.W. (2002). Salivary microbiota levels in relation to periodontal status, experience of caries and miswak use in Sudanese adults. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(5), 411-420.
- Das, S., Krithiga, G.S., Gopalakrishnan, S. (2012). Detection of human herpes viruses in patients with chronic and aggressive periodontitis and relationship between viruses and clinical parameters. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 16(2), 203-209.
- Davis-Poynter, N.J., Farrell, H.E. (1996). Masters of deception: A review of herpesvirus immune evasion strategies. *Immunology and Cell Biology*, 74(6), 513-522.
- Dawson, D.R., Wang, C., Danaher, R.J., Lin, Y., Kryscio, R.J., Jacob, R.J., Miller, C.S. (2009a). Real-time polymerase chain reaction to determine the prevalence and copy number of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus DNA in subgingival plaque at individual healthy and periodontal disease sites. *Journal of Periodontology*, 80(7), 1133-1140.
- Dawson, D.R.3rd., Wang, C., Danaher, R.J., Lin, Y., Kryscio, R.J., Jacob, R.J., Miller, C.S. (2009b). Salivary levels of Epstein-Barr virus DNA correlate with subgingival levels, not severity of periodontitis. *Oral Diseases*, 15(8), 554-559.
- de Jong, M.H., van der Hoeven, J.S. (1987). The growth of oral bacteria on saliva. *Journal of Dental Research*, 66(2), 498-525.
- de Ory Manchón, F. (1994). *Contribución al diagnóstico y la epidemiología de las infecciones por virus EPSTEIN-BARR, citomegalovirus y virus herpes humano-6*. (Tesis doctoral). Universidad Complutense, Madrid.
- de Ory Manchón, F., Sanz Moreno, J.C., Castañeda López, R., Ramírez Fernández, R., León Rega, P., Pachón del Amo, I. (2001). Seroepidemiología frente a citomegalovirus en la Comunidad de Madrid. *Revista Española de Salud Pública*, 75(1), 55-62.
- de Ory, F., Ramírez, F., García Comas, L., León, P., Sagües, M.J., Sanz, J.C. (2004). Is there a change in cytomegalovirus seroepidemiology in Spain? *European Journal of Epidemiology*, 19(1), 85-89.
- de Paschale, M., Clerici, P. (2012). Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World Journal of Virology*, 1(1), 31-43.
- de Waal, Y.C., Winkel, E.G., Raangs, G.C., van der Vusse, M.L., Rossen, J.W., van Winkelhoff, A.J. (2014). Changes in oral microflora after full-mouth tooth extraction: a prospective cohort study. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(10), 981-989.
- Delima, S.L., McBride, R.K., Preshaw, P.M., Heasman, P.A., Kumar, P.S. (2010). Response of subgingival bacteria to smoking cessation. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(7), 2344-2349.

- Deng, T., Wang, L., Lv, J., Pang, J., Liu, B., Du, Y., Ke, J. (2011). Association of three bacterial species and periodontal status in chinese adults: an epidemiological approach. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(1), 184-188.
- Díaz-Zúñiga, J., Yáñez, J.P., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Hernández, M., Sanz, M., Vernal, R. (2014). Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(3), 242-251.
- Dibart, S., Skobe, Z., Snapp, K.R., Socransky, S.S., Smith, C., Kentt, R. (1998). Identification of bacterial species on or in crevicular epithelial cells from healthy and periodontally disease patients using DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiology and Immunology*, 13(1), 30-35.
- Dietrich, T., Sharma, P., Walter, C., Weston, P., Beck, J. (2013). The epidemiological evidence behind the association between periodontitis and incident atherosclerotic cardiovascular disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(Suppl 14), S70-84.
- Ding, C., Ji, X., Chen, X., Xu, Y., Zhong, L. (2014). TNF- $\alpha$  gene promoter polymorphisms contribute to periodontitis susceptibility: evidence from 46 studies. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(8), 748-759.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193.
- Doungudomdacha, S., Rawlinson, A., Walsh, T., Douglas, C. (2001). Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* at adult periodontitis sites. *Journal of Clinical Periodontology*, 28(5), 437-445.
- Drewl, W.L. (2007). Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 20(4), 408-411.
- Dye, B.A. (2012). Global periodontal disease epidemiology. *Periodontology 2000*, 58(1), 10-25.
- Eick, S., Pfister, W. (2002). Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(7), 638-644.
- Eke, P.I., Dye, B.A., Wei, L., Thornton-Evans, G.O., Genco, R.J., Beck, J., Douglass, G., Page, R. (2012). Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *Journal of Dental Research*, 91(10), 914-920.
- Elamin, A., Albandar, J.M., Poulsen, K., Ali, R.W., Bakken, V. (2011). Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Sudanese patients with aggressive periodontitis: a case-control study. *Journal of Periodontal Research*, 46(3), 285-291.
- Elter, J.R., White, B.A., Gaynes, B.N., Bader, J.D. (2002). Relationship of clinical depression to periodontal treatment outcome. *Journal of Periodontology*, 73(4), 441-449.
- Emrich, L.J., Sholssman, M., Genco, R.J. (1991). Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Periodontology*, 62(2), 123-131.

- Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buchwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R.3rd., Smith, T.F. (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 165-256.
- Estrela, C.R., Pimenta, F.C., Alencar, A.H., Ruiz, L.F., Estrela, C. (2010). Detection of selected bacterial species in intraoral sites of patients with chronic periodontitis using multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Applied Oral Science*, 18(4), 426-431.
- Fafi-Kremer, S., Morand, P., Brion, J.P., Pavese, P., Baccard, M., Germi, R., Genoulaz, O., Nicod, S., Jolivet, M., Ruigrok, R.W., Stahl, J.P., Seigneurin, J.M. (2005). Long-term shedding of infectious Epstein-barr virus after infectious mononucleosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(6), 985-989.
- Faveri, M., Figueiredo, L.C., Duarte, P.M., Mestnik, M.J., Mayer, M.P., Feres, M. (2009). Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(9), 739-749.
- Feire, A.L., Koss, H., Compton, T. (2004). Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(43), 1570-1575.
- Franch-Chillida, F., Nibali, L., Madden, I., Donos, N., Brett, P. (2010). Association between interleukin-6 polymorphisms and periodontitis in Indian non-smokers. *Journal of Clinical Periodontology*, 37(2), 137-144.
- Fujise, O., Hamachi, T., Inoue, K., Miura, M., Maeda, K. (2002). Microbiological markers for prediction and assessment of treatment outcome following non-surgical periodontal therapy. *Journal of Periodontology*, 73(11), 1253-1259.
- Furuholm, J., Sorsa, T., Qvarnström, M., Janket, S., Tervahartiala, T., Nuutinen, P., Meurman, J.H. (2006). Salivary matrix metalloproteinase-8 in patients with and without coronary heart disease may indicate an increased susceptibility to periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 41(5), 486-489.
- Gamadia, L.E., Rentenaar, R.J., van Lier, R.A., ten Berge, I.J. (2004). Properties of CD4(+) T cells in human cytomegalovirus infection. *Human Immunology*, 65(4), 486-492.
- Gautheret-Dejean, A., Aubin, J.T., Poirel, L., Huraux, J.M., Nicolas, J.C., Rozenbaum, W., Agut, H. (1997). Detection of human *Betaherpesvirinae* in saliva and urine from immunocompromised and immunocompetent subjects. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), 1600-1603.
- Gemmell, E., Seymour, G.J. (1998). Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. *Journal of Dental Research*, 77(1), 16-26.
- Genco, R.J., Grossi, S.G., Ho, A., Nishimura, F., Murayama, Y. (2005). A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *Journal of Periodontology*, 76(Suppl 11), 2075- 2084.
- Genco, R.J., Borgnakke, W.S. (2013). Risk factors for periodontal disease. *Periodontology 2000*, 62(1), 59-94.

- Giannobile, W.V., McDevitt, J.T., Niedbala, R.S., Malamud, D. (2011). Translational and clinical applications of salivary diagnostics. *Advances in Dental Research*, 23(4), 375-380.
- Gibbs, R.A. (1990). DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry*, 62(13), 1202-1214.
- Gmür, R., Strub, J.R., Guggenheim, B. (1989). Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. *Journal of Periodontal Research*, 24(2), 113-120.
- Gonzales, J.R., Michel, J., Diete, A., Herrmann, J.M., Bodeker, R.H., Meyle, J. (2002). Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 loci in aggressive and chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(9), 816-822.
- Gonzales, J.R., Kobayashi, T., Michel, J., Mann, M., Yoshie, H., Meyle, J. (2004). Interleukin-4 gene polymorphisms in Japanese and Caucasian patients with aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(5), 384-389.
- Gorman, A., Kaye, E.K., Apovian, C., Fung, T.T., Nunn, M., Garcia, R.I. (2012a). Overweight and obesity predict time to periodontal disease progression in men. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(2), 107-114.
- Gorman, A., Kaye, E.K., Nunn, M., Garcia, R.I. (2012b). Changes in body weight and adiposity predict periodontitis progression in men. *Journal of Dental Research*, 91(10), 921-926.
- Grande, S.R., Imbronito, A.V., Okuda, O.S., Lotufo, R.F., Magalhães, M.H., Nunes, F.D. (2008). Herpes viruses in periodontal compromised sites: comparison between HIV-positive and -negative patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(10), 838-845.
- Grande, S.R., Imbronito, A.V., Okuda, O.S., Pannuti, C.M., Nunes, F.D., Lima, L.A. (2011). Relationship between herpesviruses and periodontopathogens in patients with HIV and periodontitis. *Journal of Periodontology*, 82(10), 1442-1452.
- Granswinkel, J.E., van der Velden, U., van Winkelhoff, A.J., Hoek, F.J., Loos, B.G. (2004). Plasma antibody levels in periodontitis patients and controls. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(7), 562-568.
- Gratama, J.W., Oosterveer, M.A.P., Klein, G., Ernberg, I. (1990). EBNA size polymorphism can be used to trace Epstein-Barr virus spread within families. *Journal of Virology*, 64(10), 4703-4708.
- Gratama, J.W., Lannette, E.T., Lönnqvist, B., Oosterveer, M.A., Klein, G., Ringdén, O., Ernberg, I. (1992). Detection of multiple Epstein-Barr viral strains in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Journal of Medical Virology*, 37(1), 39-47.
- Grenier, G., Gagnon, G., Grenier, D. (2009). Detection of herpetic viruses in gingival crevicular fluid of patients suffering from periodontal diseases: prevalence and effect of treatment. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(6), 506-509.
- Griffen, A.L., Lyons, S.R., Becker, M.R., Moeschberger, M.L., Leys, E.J. (1999). *Porphyromonas gingivalis* strain variability and periodontitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(12), 4028-4033.



- Griffen, A.L., Beall, C.J., Campbell, J.H., Firestone, N.D., Kumar, P.S., Yang, Z.K., Podar, M., Leys, E.J. (2012). Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *The ISME Journal*, 6(6), 1176-1185.
- Grinde, B. (2013). Herpesviruses: latency and reactivation – viral strategies and host response. *Journal of Oral Microbiology*, 25(5), doi: 10.3402/jom.v5i0.22766.22766.
- Grossi, S.G., Zambon, J.J., Ho, A., Koch, G.G., Dunford, R.G., Machtei, E.E., Norderyd, O., Genco, R.J. (1994). Assessment of risk for periodontal disease I. Risk indicators for attachment loss. *Journal of Periodontology*, 65(3), 260-267.
- Grossi, S.G., Genco, R., Machtei, E.E., Ho, A., Koch, G.G., Dunford, R.G., Zambon, J.J., Hausmann, E. (1995). Assessment of risk for periodontal disease II. Risk indicators for alveolar bone loss. *Journal of Periodontology*, 66(1), 23-29.
- Gunkel, J., Wolfs, T.F., de Vries, L.S., Nijman, J. (2014). Predictors of severity for postnatal cytomegalovirus infection in preterm infants and implications for treatment. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 12(11), 1345-1355.
- Gursoy, U.K., Könönen, E., Pussinen, P.J., Tervahartiala, T., Hyvärinen, K., Suominen, A.L., Uitto, V.J., Paju, S., Sorsa, T. (2011). Use of host- and bacteria-derived salivary markers in detection of periodontitis: a cumulative approach. *Disease Markers*, 30(6), 299-305.
- Gursoy, U.K., Könönen, E., Huuonen, S., Tervahartiala, T., Pussinen, P.J., Suominen, A.L., Sorsa, T. (2013). Salivary type I collagen degradation end-products and related matrix metalloproteinases in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(1), 18-25.
- Habbal, W., Monem, F., Gartner, B.C. (2009). Comparative evaluation of published cytomegalovirus primers for rapid real-time PCR: which are the most sensitive? *Journal of Medical Microbiology*, 58(Pt 7), 878-883.
- Haffajee, A., Socransky, S. (1992). Effect of sampling strategy on the false-negative rate for detection of selected subgingival species. *Oral Microbiology and Immunology*, 7(1), 57-59.
- Haffajee, A., Socransky, S., Dzink, J.L., Taubman, M.A., Ebersole, J.L., Smith, D.J. (1998). Clinical and microbiological and immunological features of subjects with destructive periodontal diseases. *Journal of Periodontology*, 15(4), 240-246.
- Haffajee, A.D., Socransky, S.S. (2006a). Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. *Periodontology* 2000, 5, 78-11.
- Haffajee, A.D., Teles, R.P., Socransky, S.S. (2006b). Association of *Eubacterium nodatum* and *Treponema denticola* with human periodontitis lesions. *Oral Microbiology and Immunology*, 21(5), 269-282.
- Haffajee, A.D., Yaskell, T., Torresyap, G., Teles, R., Socransky, S.S. (2009). Comparison between polymerase chain reaction-based and checkerboard DNA hybridization techniques for microbiol assessment of subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(8), 642-649.

- Hamlet, S.M., Cullinan, M.P., Westerman, B., Lindeman, M., Bird, P.S., Palmer, J., Seymour, G.J. (2001). Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in an Australian population. *Journal of Clinical Periodontology*, 28(12), 1163-1171.
- Hamlet, S., Ellwood, R., Cullinan, M., Worthington, H., Palmer, J., Bird, P., Narayanan, D., Davies, R., Seymour, G. (2004). Persistent colonization with *Tannerella forsythensis* and loss of attachment in adolescents. *Journal of Dental Research*, 83(3), 232-235.
- Hanookai, D., Nowzari, H., Contreras, A., Morrison, J.L., Slots, J. (2000). Herpesviruses and periodontopathic bacteria in trysomy 21 periodontitis. *Journal of Periodontology*, 71(3), 376-384.
- Haririan, H., Andrukhov, O., Bertl, K., Lettner, S., Kierstein, S., Moritz, A., Rausch-Fan, X. (2014). Microbial analysis of subgingival plaque samples compared to that of whole saliva in patients with periodontitis. *Journal of Periodontology*, 85(6), 819-828.
- Hatton, O.L., Harris-Arnold, A., Schaffert, S., Krams, S.M., Martinez, O.M. (2014). The interplay between Epstein-Barr virus and B lymphocytes: implications for infection, immunity, and disease. *Immunologic Research*, 58(2-3), 268-276.
- Hayden, R.T., Shahbazian, M.D., Valsamakis, A., Boonyaratanakornkit, J., Cook, L., Pang, X.L., Preiksaitis, J.K., Schönbrunner, E.R., Caliendo, A.M. (2013). Multicenter evaluation of a commercial cytomegalovirus quantitative standard: effects of commutability on interlaboratory concordance. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(11), 3811-3817.
- He, J., Huang, W., Pan, Z., Cui, H., Qi, G., Zhou, X., Chen, H. (2012). Quantitative analysis of microbiota in saliva, supragingival, and subgingival plaque of Chinese adults with chronic periodontitis. *Clin Oral Investigations*, 16(6), 1579-1588.
- Heasman, L., Stacey, F., Preshaw, P.M., McCracken, G.I., Hepburn, S., Heasman, P.A. (2006). The effect of smoking on periodontal treatment response: a review of clinical evidence. *Journal of Clinical Periodontology*, 33(4), 241-253.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986-994.
- Heitz-Mayfield, L.J. (2005). Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(Suppl 6), 196-209.
- Herrera, D., Contreras, A., Gamonal, J., Oteo, A., Jaramillo, A., Silva, N., Sanz, M., Botero, J.E., León, R. (2008). Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(2), 106-113.
- Higgings, C.D., Swerdlow, A.J., Macsween, K.F., Harrison, N., Williams, H., McAulay, K., Thomas, R., Reid, S., Conacher, M., Britton, K., Crawford, D.H. (2007). A study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes. *The Journal of Infectious Diseases*, 195(4), 474-482.

- Holt, S.C., Ebersole, J.L. (2005). *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*: the “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology 2000*, 38, 72-122.
- Horning, G.M., Cohen, M.E. (1995). Necrotizing ulcerative gingivitis, periodontitis, and stomatitis: clinical staging and predisposing factors. *Journal of Periodontology*, 66(11), 990-998.
- Hugoson, A., Thortensson, H., Falk, H., Kuylensstierna, J. (1989). Periodontal conditions in insulin-dependent diabetics. *Journal of Clinical Periodontology*, 16(4), 215-223.
- Hutto, C., Little, E.A., Ricks, R., Lee, J.D., Pass, R.F. (1986). Isolation of cytomegalovirus from toys and hands in a day care center. *The Journal of Infectious Diseases*, 154(3), 527-530.
- Hyatt, R., Tan-ariya, P., Paca-uccaralertkun, S., Mungthin, M., Pongpong, S. (2014). Prevalence and gB genotype distribution of human cytomegalovirus among HIV sero-negative and HIV sero-positive orphans in Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 97(Suppl 2), S136-144.
- Ide, M., Papapanou, P.N. (2013). Epidemiology of association between maternal periodontal disease and adverse pregnancy outcomes--systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(Suppl 14), S181-S194.
- Idesawa, M., Sugano, N., Ikeda, K., Oshikawa, M., Takane, M., Seki, K., Ito, K. (2004). Detection of Epstein-Barr virus in saliva by real-time PCR. *Oral Microbiology and Immunology*, 19(4), 230-232.
- Ikeda, T., Kobayashi, R., Kogashiwa, Y., Matsuda, T., Kohno, N. (2014). Epstein-barr virus diversity in immunocompetent healthy persons: reassessment of the distribution of genetic variants. *Journal of Medical Virology*, 86(2), 301-305.
- Ikegami, A., Honma, K., Sharma, A., Kuratmisu, H.K. (2004). Multiple functions of the leucine-rich repeat protein LrrA of *Treponema denticola*. *Infection and Immunity*, 72(8), 4619-4627.
- Ikegaya, H., Motani, H., Sakurada, K., Sato, K., Akutsu, T., Yoshino, M. (2008). Forensic application of Epstein-Barr virus genotype: correlation between viral genotype and geographical area. *Journal of Virological Methods*, 147(1), 78-85.
- Imai, K., Inoue, H., Tamura, M., Cueno, M.E., Inoue, H., Takeichi, O., Kusama, K., Saito, I., Ochiai, K. (2012). The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* induces the Epstein-Barr virus lytic switch transactivator ZEBRA by histone modification. *Biochimie*, 94(3), 839-846.
- Imbronito, A.V., Grande, S.R., Freitas, N.M., Okuda, O., Lotufo, R.F., Nunes, F.D. (2008a). Detection of Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in blood and oral samples: comparison of three sampling methods. *Journal of Oral Science*, 50(1), 25-31.
- Imbronito, A.V., Okuda, O.S., Maria de Freitas, N., Moreira Lotufo, R.F., Nunes, F.D. (2008b). Detection of herpesviruses and periodontal pathogens in subgingival plaque of patients with chronic periodontitis, generalized aggressive periodontitis, or gingivitis. *Journal of Periodontology*, 79(12), 2313-2321.

- Iniesta Albentosa, M.I. (2007). *Detección de patógenos periodontales mediante sondas de ADN*. (Tesis doctoral). Universidad Complutense, Madrid.
- Jansson, L. (2008). Association between alcohol consumption and dental health. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(5), 379-384.
- Jervøe-Storm, P.M., Koltzsch, M., Falk, W., Dörfler, A., Jepsen, S. (2005). Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(7), 778-783.
- Johnson, B.D., Engel, D. (1986). Acute necrotizing ulcerative gingivitis. A review of diagnosis, etiology and treatment. *Journal of Periodontology*, 57(3), 141-150.
- Jost, S., Altfeld, M. (2013). Control of human viral infections by natural killer cells. *Annual Review of Immunology*, 31, 163-194.
- Kaltenboech, B., Wagn, C. (2005). Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Advances in Clinical Chemistry*, 40, 219-249.
- Kamma, J.J., Nakou, M., Baehni, P.C. (1999). Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 34(1), 25-33.
- Kamma, J.J., Contreras, A., Slots, J. (2001). Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 28(9), 879-885.
- Kamma, J.J., Baehni, P.C. (2003). Five-year maintenance follow-up of early-onset periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 30(6), 562-572.
- Karimbux, N.Y., Saraiya, V.M., Elangovan, S., Allareddy, V., Kinnunen, T., Kornman, K.S., Duff, G.W. (2012). Interleukin-1 gene polymorphisms and chronic periodontitis in adult whites: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontology*, 83(11), 1407-1419.
- Kato, A., Imai, K., Ochiai, K., Ogata, Y. (2013). Higher prevalence of Epstein-Barr virus DNA in deeper periodontal pockets of chronic periodontitis in Japanese patients. *Public Library of Science One*, 8(8), e71990.
- Kaufman, E., Lamster, I.B. (2002). The diagnostic applications of saliva--a review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 13(2), 197-212.
- Kawada, M., Yoshida, A., Suzuki, N., Nakano, Y., Saito, T., Oho, T., Koga, T. (2004). Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in relation to periodontal status assessed by real-time PCR. *Oral Microbiology and Immunology*, 19(5), 289-292.
- Keller, A., Rohde, J.F., Raymond, K., Heitmann, B.L. (2015). Association between periodontal disease and overweight and obesity: a systematic review. *Journal of Periodontology*, 86(6), 766-776.
- Khanna, R., Burrows, S.R., Kurilla, M.G, Jacob, C.A., Misko, I.S., Sculley, T.B., Kieff, E., Moss, D.J. (1992). Localization of Epstein-Barr virus cytotoxic T cell epitopes using recombinant vaccinia: implications for vaccine development. *The Journal of Experimental Medicine*, 176(1), 169-76.

- Kieff, E., Rickinson, A.B. (2007). Epstein-Barr virus and its replication. En: DM. Knipe, PM. Howley (Eds.), *Fields virology* (pp. 2603-2654). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kim, T.S., Frank, P., Eickholz, P., Eick, S., Kim, C.K. (2009). Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with different ethnic backgrounds. *Journal of Periodontology*, 80(12), 2020-2027.
- Kinane, D.F., Hodge, P., Eskdale, J., Ellis, R., Gallagher, G. (1999). Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumor necrosis factor loci in early-onset periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 34(7), 379-386.
- Kinane, D.F., Chestnutt, I.G. (2000). Smoking and periodontal disease. *Critical Review in Oral Biology and Medicine*, 11(3), 356-365.
- Kinane, D.F., Berglundh, T., Lindhe, J. (2009). Pathogenesis of periodontitis. En: J. Lindhe, NP. Lang, T. Karring (Eds.), *Clinical Periodontology and Implant Dentistry* (pp. 285-306). Oxford: Blackwell Publishing.
- Kinney, J.S., Morelli, T., Braun, T., Ramseier, C.A., Herr, A.E., Sugai, J.V., Shelburne, C.E., Rayburn, L.A., Singh, A.K., Giannobile, W.V. (2011). Saliva/pathogen biomarker signatures and periodontal disease progression. *Journal of Dental Research*, 90(6), 752-758.
- Klemenc, P., Shaleric, U., Artnik, B., Nogrsek, P., Marin, J. (2005). Prevalence of some herpesvirus in gingival crevicular fluid. *Journal of Clinical Virology*, 34(2), 147-152.
- Kocher, T., Sawaf, H., Fanghanel, J., Timm, R., Meisel, P. (2002). Association between bone loss in periodontal disease and polymorphism of N-acetyltransferase (NAT2). *Journal of Clinical Periodontology*, 29(1), 21-27.
- Kolenbrander, P.E. (2011). Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. *International Journal of Oral Science*, 3(2), 49-54.
- Komiya, A., Kato, T., Nakagawa, T., Saito, A., Takahashi, J., Yamada, S., Okuda, K. (2000). A rapid DNA probe method for detection of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Periodontology*, 71(5), 760-767.
- König, J., Holtfreter, B., Kocher T. (2010). Periodontal health in Europe: future trends based on treatments needs and the provision of periodontal services - position paper 1. *European Journal of Dental Education*, 14(Supp 1), 4-24.
- Könönen, E., Asikainen, S., Saarela, M., Karjalainen, J., Jousimies-Somer, H. (1994). The oral gram-negative anaerobic microflora in young children: longitudinal changes from edentulous to dentate mouth. *Oral Microbiology and Immunology*, 9(3), 136-141.
- Könönen, E., Paju, S., Pussinen, P.J., Hyvönen, M., Di Tella, P., Suominen-Taipale, L., Knuuttila, M. (2007). Population-based study of salivary carriage of periodontal pathogens in adults. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(8), 2446-2451.
- Konstantinidis, A., Sakellari, D., Papa, A., Antoniadis, A. (2005). Real-time polymerase chain reaction quantification of Epstein-Barr virus in chronic periodontitis patients. *Journal of Periodontal Research*, 40(4), 294-298.

- Korndewal, M.J., Mollema, L., Tcherniaeva, I., van der Klis, F., Kroes, A.C., Oudesluys-Murphy, A.M., Vossen, A.C., de Melker, H.E. (2015). Cytomegalovirus infection in the Netherlands: seroprevalence, risk factors, and implications. *Journal of Clinical Virology*, 63, 53-58.
- Kornman, K.S., Crane, A., Wang, H.Y., di Giovine, F.S. (1997a). The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(1), 72-77.
- Kornman, K.S., Page, R.C., Tonetti, M.S. (1997b). The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology 2000*, 14, 33-53.
- Kotwal, G.J. (1997). Microorganisms and their interaction with the immune system. *Journal of Leukocyte Biology*, 62(4), 415-429.
- Kraft, C.S., Armstrong, W.S., Caliendo, A.M. (2012). Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: understanding the laboratory perspective. *Clinical Infectious Diseases*, 54(12), 1793-1797.
- Kubar, A., Saygun, I., Yapar, M., Özdemir, A., Slots, J. (2004). Real-time PCR quantification of cytomegalovirus in aggressive periodontitis lesions using TaqMan technology. *Journal of Periodontal Research*, 39(2), 81-86.
- Kubar, A., Saygun, I., Özdemir, A., Yapar, M., Slots, J. (2005). Real-time polymerase chain reaction quantification of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in periodontal pockets and the adjacent gingiva of periodontitis lesions. *Journal of Periodontal Research*, 40(2), 97-104.
- Kutok, J.L., Wang, F. (2006). Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annual Review of Pathology*, 1, 375-404.
- Lalla, E., Lamster, I.B., Drury, S., Fu, C., Schmidt, A.M. (2000). Hyperglycemia, glycoxidation and receptor for advanced glycation endproducts: potential mechanisms underlying diabetes complications, including diabetes-associated periodontitis. *Periodontology 2000*, 23, 50-62.
- Laine, M.L., Crielaard, W., Loss, B.G. (2012). Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontology 2000*, 58(1), 37-68.
- Landis, J.R., Koch, G.G. (1977). An application of hierarchical Kappa-type statistics in the assesment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics*, 33(2), 363-374.
- Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Morillo, J.M., Martín, C., Silva, A. (2004). Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(12), 1061-1069.
- Leblebicioglu, B., Dulekci, G., Cifci, S., Keskin, F., Badur, S. (2009). Salivary detection of periodontopathic bacteria and periodontal health status in dental student. *Anaerobe*, 15(3), 82-86.

- Lee, J.W., Choi, B.K., Yoo, Y.J., Choi, S.H., Cho, K.S., Chai, J.K., Kim, C.K. (2003). Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology*, 74(9), 1329-1335.
- Li, W., Xiao, L., Hu, J. (2013). Matrix metalloproteinase-1 promoter-1607 1G/2G polymorphism and chronic periodontitis susceptibility: a meta-analysis and systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(12), 1095-1103.
- Liljestrand, J.M., Gursoy, U.K., Hyvärinen, K., Sorsa, T., Suominen, A.L., Könönen, E., Pussinen, P.J. (2014). Combining salivary pathogens and salivary antibody levels improves their diagnostic ability in detection of periodontitis. *Journal of Periodontology*, 85(1), 123-131.
- Lin, Y.L., Li, M. (2009). Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus inhibit oral bacteria-induced macrophage activation and phagocytosis. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(3), 243-248.
- Linden, G.J., Lyons, A., Scannapieco, F.A. (2013). Periodontal systemic association: review of the evidence. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(Suppl 14), S8-19.
- Ling, L.J., Ho, C.C., Wu, C.Y., Chen, Y.T., Hung, S.L. (2004). Association between human herpesviruses and the severity of periodontitis. *Journal of Periodontology*, 75(11), 1479-1485.
- Liu, J., Duan, Y. (2012). Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncology*, 48(7), 569-577.
- Llodra Calvo, J.C., Bravo Pérez, M., Cortés Martinicorena, F.J. (2002). Encuesta de salud oral de España (2000). *Revista del Ilustre Consejo General de colegios de Odontólogos y Estomatólogos de España*, 7, 19-63.
- Llodra Calvo, J.C. (2012). Encuesta de salud oral en España. *Revista del Ilustre Consejo General de colegios de Odontólogos y Estomatólogos de España*, 17(1), 13-41.
- Loesche, W.J. (1992). DNA probe and enzyme analysis in periodontal diagnostics. *Journal of Periodontology*, 63(Suppl 12), 1102-1109.
- Loewendorf, A., Benedict, C.A. (2010). Modulation of host innate and adaptive immune defenses by cytomegalovirus: timing is everything. *Journal of Internal Medicine*, 267(5), 483-501.
- Loo, J.A., Yan, W., Ramachandran, P., Wong, D.T. (2010). Comparative human salivary and plasma proteomes. *Journal of Dental Research*, 89(10), 1016-1023.
- Loomis, R.J., Lilja, A.E., Monroe, J., Balabanis, K.A., Brito, L.A., Palladino, G., Franti, M., Mandl, C.W., Barnett, S.W., Mason, P.W. (2013). Vectored co-delivery of human cytomegalovirus gH and gL proteins elicits potent complement-independent neutralizing antibodies. *Vaccine*, 31(6), 919-926.
- Loozen, G., Ozcelik, O., Boon, N., De Mol, A., Schoen, C., Quirynen, M., Teughels, W. (2014). Inter-bacterial correlations in subgingival biofilms: a large-scale survey. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(1), 1-10.
- Macswen, K.F., Crawford, D.H. (2003). Epstein-Barr virus-recent advances. *The Lancet. Infectious Diseases*, 3(3), 131-140.
- Madianos, P.N., Bobetsis, Y.A., Offenbacher, S. (2013). Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease and adverse pregnancy outcomes – systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(Suppl 14), S170-180.

- Mager, D.L., Ximenez-Fyvie, L.A., Haffajee, A.D., Socransky, S.S. (2003). Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *Journal of Clinical Periodontology*, 30(7), 644-654.
- Mandel, I.D., Wotman, S. (1976). The salivary secretions in health and disease. *Oral Sciences Reviews*, 8, 25-47.
- Maney, P., Walters, J.D. (2009). Formylpeptide receptor single nucleotide polymorphism 348T>C and its relationship to polymorphonuclear leukocyte chemotaxis in aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology*, 80(9), 1498-1505.
- Manuel, O., Asberg, A., Pang, X., Rollag, H., Emery, V.C., Preiksaitis, J.K., Kumar, D., Pescovitz, M.D., Bignamini, A.A., Hartmann, A., Jardine, A.G., Humar, A. (2009). Impact of genetic polymorphisms in cytomegalovirus glycoprotein B on outcomes in solid-organ transplant recipients with cytomegalovirus disease. *Clinical Infectious Diseases*, 49(8), 1160-1166.
- Mariette, X., Cazals-Hatem, D., Agbalika, F., Brunet, M., Morinet, F., Gluckman, E. (1996). Absence of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus expression in labial salivary glands of patients with chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplantation*, 17(4), 607-610.
- Marsh, P.D., Bradshaw, D.J. (1995). Dental plaque as biofilm. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(3), 169-175.
- Marsh, P.D. (1997). Physiological approaches to the control of oral biofilms. *Advances in Dental Research*, 11(1), 176-185.
- Martínez-Pabón, M.C., Restrepo-Ospina, D.P., Isaza-Guzmán, D.M., Orozco-Rojas, L.M., Tobón-Aroyave, S.I. (2008). Detection of *Treponema denticola* in saliva obtained from patients with various periodontal conditions. *Clinical Oral Investigations*, 12(1), 73-81.
- Martínez-Pabón, M.C., Martínez-Gaviria, A., Isaza-Gurmán, D.M., Markús-López, C.E., Tobón-Aroyave, S.I. (2010). Confounding and interaction effect of *Treponema denticola* salivary carriage in chronic periodontitis. *Oral Diseases*, 16(3), 278-285.
- Mättö, J., Saarela, M., von Troil-Lindén, B., Alaluusua, S., Jousimies-Somer, H., Asikainen, S. (1996). Similarity of salivary and subgingival *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Oral Microbiology and Immunology*, 11(6), 395-401.
- Mättö, J., Saarela, M., Alaluusua, S., Oja, V., Jousimies-Somer, H., Asikainen, S. (1998). Detection of *Porphyromonas gingivalis* from saliva by PCR by using a simple sample-processing method. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(1), 157-160.
- McClellan, D.L., Griffen, A.L., Leys, E.J. (1996). Age and prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in children. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(8), 2017-2019.
- McGrath, C., Bedi, R. (2001). Can dentures improve the quality of life of those who have experienced considerable tooth loss? *Journal of Dentistry*, 29(4), 243-246.



- McGrath, C., Bedi, R. (2004). The association between dental anxiety and oral health-related quality of life in Britain. *Community Dental Oral Epidemiology*, 32(1): 67-72.
- Meisel, P., Timm, R., Sawaf, H., Fanghanel, J., Siegmund, W., Kocher, T. (2000). Polymorphism of the N-acetyltransferase (NAT2), smoking and the potential risk of periodontal disease. *Archives of Toxicology*, 74(6), 343-348.
- Meng, H., Xu, L., Li, Q., Han, J., Zhao, Y. (2007). Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 43, 133-159.
- Merne, M.E., Syrjänen, S.M. (1996). Detection of Epstein-Barr virus in salivary gland specimens from Sjögren's syndrome patients. *Laryngoscope*, 106(12 Pt 1), 1534-1539.
- Michalowicz, B.S., Ronderos, M., Camara-Silva, R., Contreras, A., Slots, J. (2000). Human herpesviruses and *Porphyromonas gingivalis* are associated with juvenile periodontitis. *Journal of Periodontology*, 71(6), 981-988.
- Miller, C.S., Avdiushko, S.A., Kryscio, R.J., Danaher, R.J., Jacob, R.J. (2005). Effect of prophylactic valacyclovir on the presence of human herpesvirus DNA in saliva of healthy individuals after dental treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2173-2180.
- Miller, C.S., Berger, J.R., Mootoor, Y., Avdiushko, S.A., Zhu, H., Kryscio, R.J. (2006). High prevalence of multiple human herpesviruses in saliva from human immunodeficiency virus-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7), 2409-2415.
- Miller, C.S., Foley, J.D., Bailey, A.L., Campbell, C.L., Humphries, R.L., Christodoulides, N., Floriano, P.N., Simmons, G., Bhagwandin, B., Jacobson, J.W., Redding, S.W., Ebersole, J.L., McDevitt, J.T. (2010). Current developments in salivary diagnostics. *Biomarkers in Medicine*, 4(1), 171-189.
- Mineoka, T., Awano, S., Rikimaru, T., Kurata, H., Yoshida, A., Ansai, T., Takehara, T. (2008). Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque. *Journal of Periodontology*, 79(4), 670-676.
- Mínguez, M., Pousa, X., Herrera, D., Blasi, A., Sánchez, M.C., León, R., Sanz, M. (2014). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolated from a population of periodontitis patients in Spain. *Archives of Oral Biology*, 59(12), 1359-1367.
- Minneman, M.A., Cobb, C.W., Soriano, F., Burns, S., Schuchman, L. (1995). Relationships of personality traits and stress to gingival status or soft-tissue oral pathology: an exploratory study. *Journal of Public Health Dentistry*, 55(1), 22-27.
- Missailidis, C.G., Umeda, J.E., Ota-Tsuzuki, C., Anzai, D., Mayer, M.P. (2004). Distribution of fimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with various periodontal conditions. *Oral Microbiology and Immunology*, 19(4), 224-229.

- Mocarski, E.S., Shenk, T., Pass, R.F. (2007). Cytomegaloviruses. En: DM. Knipe, PM. Howley (Eds.), *Fields Virology* (pp. 2701-2772). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Mogensen, T.H., Paludan, S.R. (2001). Molecular pathways in virus-induced cytokine production. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 131-150.
- Mombelli, A., McNabb, H., Lang, N.P. (1991). Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P. gingivalis*. *Journal of Periodontal Research*, 26(4), 308-313.
- Moore, M.D., Cannon, M.J., Sewall, A., Finlayson, M., Okimoto, M., Nemerow, G.R. (1991). Inhibition of Epstein-Barr virus infection in vitro and in vivo by soluble CR2 (CD21) containing two short consensus repeats. *Journal of Virology*, 65(7), 3559-3565.
- Morgan, D.G., Niederman, J.C., Miller, G., Smith, H.W., Dowaliby, J.M. (1979). Site of Epstein-Barr virus replication in the oropharynx. *Lancet*, 2(8153), 1154-1157.
- Morikawa, M., Chiba, T., Tomii, N., Sato, S., Takahashi, Y., Konishi, K., Numame, Y., Iwata, K., Imai, K. (2008). Comparative analysis of putative periodontopathic bacteria by multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Periodontal Research*, 43(3), 268-274.
- Morita, I., Okamoto, Y., Yoshii, S., Nakagaki, H., Mizuno, K., Sheiham, A., Sabbah, W. (2011). Five-year incidence of periodontal disease is related to body mass index. *Journal of Dental Research*, 90(2), 199-202.
- Moss, P., Khan, N. (2004). CD8 (+) T-cell immunity to cytomegalovirus. *Human Immunology*, 65(5), 456-465.
- Mühlemann, H.R., Son, S. (1971). Gingival sulcus bleeding--a leading symptom in initial gingivitis. *Helvetica Odontologica Acta*, 15(2), 107-113.
- Mulder, J., Mckinney, N., Christopherson, C., Sninsky, J., Greenfield, L., Kwok, S. (1994). Rapid and simple PCR assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(2), 292-300.
- Müller, H.P., Heinecke, A., Fuhrmann, A., Eger, T., Zöller, L. (2001). Intraoral distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in young adults with minimal periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 36(2), 114-123.
- Murata, T. (2014). Regulation of Epstein-Barr virus reactivation from latency. *Microbiology and Immunology*, 58(6), 307-317.
- Nascimento, G.G., Leite, F.R., Do, L.G., Peres, K.G., Correa, M.B., Demarco, F.F., Peres, M.A. (2015). Is weight gain associated with the incidence of periodontitis? A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(6), 495-505.
- Navazesh, M. (1993). Methods for collecting saliva. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 20(694), 72-77.
- Needleman, I., McGrath, C., Floyd, P., Biddle, A. (2004). Impact of oral health on the life quality of periodontal patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(6), 454-457.

- Nemerow, G.R., Mullen, J.J.3rd., Dickson, P.W., Cooper, N.R. (1990). Soluble recombinant CR2 (CD21) inhibits Epstein-Barr virus infection. *Journal of Virology*, 64(3), 1348-1352.
- Neumaier, M., Braun, A., Wagener, S. (1998). Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. International Federation of Clinical Chemistry Scientific Division Committee on Molecular and Biology Techniques. *Clinical Chemistry*, 44(1), 12-26.
- Nguyen-Hieu, T. (2013). Microbial sampling process can change results of microbiological analysis in periodontitis diagnosis. A minireview. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 4(3), 151-159.
- Nibali, L., Atkinson, C., Griffiths, P., Darbar, U., Rakmanee, T., Suvan, J., Donos, N. (2009). Low prevalence of subgingival viruses in periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(11), 928-932.
- Nibali, L., D'Aiuto, F., Ready, D., Parkar, M., Yahaya, R., Donos, N. (2012). No association between *A actinomycetemcomitans* or *P gingivalis* and chronic or aggressive periodontitis diagnosis. *Quintessence International*, 43(3), 247-254.
- Nishimura, F., Murayama, Y. (2001). Periodontal inflammation and insulin resistance--lessons from obesity. *Journal of Dental Research*, 80(8), 1690-1694.
- Nociti, F.H.Jr., Casati, M.Z., Duarte, P.M. (2015). Current perspective of the impact of smoking on the progression and treatment of periodontitis. *Periodontology 2000*, 67(1), 187-210.
- Noguerol Rodríguez, B., Llodra Calvo, J.C., Sicilia Felechosa, A., Follana Murcia, M. (1995). *La salud bucodental en España. 1994. Antecedentes y perspectivas de futuro*. Madrid: Ediciones Avances.
- Novak, Z., Chowdhury, N., Ross, S.A., Pati, S.K., Fowler, K., Boppana, S.B. (2011). Diagnostic consequences of cytomegalovirus glycoprotein B polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(8), 3033-3035.
- Nowzari, H., Jorgensen, M.G., Ta, T.T., Contreras, A., Slots, J. (2001). Aggressive periodontitis associated with Fanconi's anemia. A case report. *Journal of Periodontology*, 72(11), 1601-1606.
- Nowzari, H., Jorgensen, M.G., Aswad, S., Khan, N., Osorio, E., Safarian, A., Shidban, H., Munroe, S. (2003). Human cytomegalovirus-associated periodontitis in renal transplant patients. *Transplantation Proceedings*, 35(8), 2949-2952.
- Ohga, S., Nomura, A., Takada, H., Hara, T. (2002). Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 44(3), 203-215.
- O'Leary, T.J., Drake, R.B., Naylor, J.E. (1972). The plaque control record. *Journal of Periodontology*, 43(1), 38.
- Onagawa, M., Ishihara, K., Okuda, K. (1994). Coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, 35(4), 171-181.
- Ongrádi, J., Sallay, K., Kulcsár, G. (1987). The decreased antibacterial activity of oral polymorphonuclear leukocytes coincides with the occurrence of virus-carrying oral lymphocytes and epithelial cells. *Folia Microbiologica*, 32(5), 438-447.

- Page, R.C., Kornman, K.S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000, 14, 9-11.
- Paju, S., Pussinen, P.J., Suominen-Taipale, L., Hyvönen, M., Knuuttila, M., Könönen, E. (2009). Detection of multiple pathogenic species in saliva is associated with periodontal infection in adults. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(1), 235-238.
- Palmer, R.M., Wilson, R.F., Hasan, A.S., Scott, D.A. (2005). Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking. *Journal of Clinical Periodontology*, 32 (Suppl 6), 180-195.
- Papantonopoulos, G.H. (1999). Smoking influences decision making in periodontal therapy: a retrospective clinical study. *Journal of Periodontology*, 70(10), 1166-1173.
- Pariente, M., Bartolomé, J., Lorente, S., Crespo, M.D. (2007). Distribución por edad de los patrones serológicos de infección por el virus de Epstein-Barr: revisión de resultados de un laboratorio diagnóstico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(2), 108-110.
- Park, J.B., Han, K., Park, Y.G., Ko, Y. (2014). Association between alcohol consumption and periodontal disease: the 2008 to 2010 Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of Periodontology*, 85(11), 1521-1528.
- Parra, B., Slots, J. (1996). Detection of human viruses in periodontal pockets using polymerase chain reaction. *Oral Microbiology and Immunology*, 11(5), 289-293.
- Passoja, A., Puijola, I., Knuuttila, M., Niemelä, O., Karttunen, R., Raunio, T., Tervonen, T. (2010). Serum levels of interleukin-10 and tumour necrosis factor- $\alpha$  in chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 37(10), 881-887.
- Patel, R.A., Wilson, R.F., Palmer, R.M. (2012). The effect of smoking on periodontal bone regeneration: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontology*, 83(2), 143-155.
- Pegtel, D.M., Middeldorp, J., Thorley-Lawson, D.A. (2004). Epstein-Barr virus infection in ex vivo tonsil epithelial cell cultures of asymptomatic carriers. *Journal of Virology*, 78(22), 12613-12624.
- Pellet, P.E., Roizman, B. (2007). The Family *Herpesviridae*: A brief introduction. En: DM. Knipe, PM. Howley (Eds.), *Fields Virology* (pp. 2479-2499). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Pereira, A.L., Cortelli, S.C., Aquino, D.R., Franco, G.C., Cogo, K., Rodrigues, E., Costa, F.O., Hoizhausen, M., Cortelli, J.R. (2012). Reduction of salivary arginine catabolic activity through periodontal therapy. *Quintessence International*, 43(9), 777-787.
- Periasamy, S., Kolenbrander, P.E. (2009). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* builds mutualistic biofilm communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* species in saliva. *Infection and Immunity*, 77(9), 3542-3551.
- Peruzzo, C.C., Benatti, B.B., Ambrosano, G.M., Nogueira-Filho, G.R., Sallum, E.A., Casati, M.Z., Nociti, F.H.Jr. (2007). A systematic review of stress and psychological factors as possible risk factors for periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 78(8), 1491-1504.

- Pindborg, J.J. (1951). Influence of service in armed forces on incidence of gingivitis. *The Journal of the American Dental Association*, 42(5), 517-522.
- Pitetti, R.D., Laus, S., Wadowsky, R.M. (2003). Clinical evaluation of a quantitative real time polymerase chain reaction assay for diagnosis of primary Epstein-Barr virus infection in children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 22(8), 736-739.
- Pitiphat, W., Merchant, A.T., Rimm, E.B., Joshipura, K.J. (2003). Alcohol consumption increases periodontitis risk. *Journal of Dental Research*, 82(7), 509-513.
- Puchhammer-Stöckl, E., Görzer, I. (2006). Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus subtypes- the search for clinical significance. *Journal of Clinical Virology*, 36(4), 239-248.
- Puig-Silla, M., Dasí-Fernández, F., Montiel-Company, J.M., Almerich-Silla, J.M. (2012). Prevalence of fimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis* and other periodontal bacteria in a Spanish population with chronic periodontitis. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 17(6), e1047-e1053.
- Quirynen, M., van Assche, N. (2011). Microbial changes after full-mouth extraction, followed by 2-stage implant placement. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(6), 581-589.
- Rathnayake, N., Akerman, S., Klinge, B., Lundegren, N., Jansson, H., Tryselius, Y., Sorsa, T., Gustafsson, A. (2013). Salivary biomarkers of oral health – a cross-sectional study. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(2), 140-147.
- Ready, D., D'Aiuto, F., Spratt, D.A., Suvan, J., Tonetti, M.S., Wilson, M. (2008). Disease severity associated with presence in subgingival plaque of *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Tannerella forsythia*, singly or in combination, as detected by nested multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10), 3380-3383.
- Redpath, S., Anguo, A., Gascoigne, N.R., Ghazal, P. (1999). Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10. *The Journal of Immunology*, 162(11), 6701-6707.
- Rezk, S.A., Weiss, L.M. (2007). Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Human Pathology*, 38(9), 1293-1304.
- Rickinson, A.B., Kieff, E. (2007). Epstein-Barr Virus. En: DM. Knipe, PM. Howley (Eds.), *Fields virology* (pp. 2655-2700). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Riggio, M.P., MacFarlane, T.W., Mackenzie, D., Lennon, A., Smith, A.J., Kinane, D. (1996). Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *Journal of Periodontal Research*, 31(7), 496-501.
- Rivera-Hidalgo, F. (1986). Smoking and periodontal disease. A review of the literature. *Journal of Periodontology*, 57(10), 617-624.

- Roman-Torres, C.V., Aquino, D.R., Cortelli, S.C., Franco, G.C., Dos Santos, J.G., Corraini, P., Holzhausen, M., Diniz, M.G., Gomez, R.S., Cortelli, J.R. (2010). Prevalence and distribution of serotype-specific genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis Brazilian subjects. *Archives of Oral Biology*, 55(3), 242-248.
- Rosa, E.F., Corraini, P., Inoue, G., Gomes, E.F., Guglielmetti, M.R., Sanda, S.R., Lotufo, J.P., Romito, G.A., Pannuti, C.M. (2014). Effect of smoking cessation on non-surgical periodontal therapy: results after 24 months. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(12), 1145-1153.
- Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K., Rasmussen, O.F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 17(1), 37-45.
- Rotola, A., Cassai, E., Farina, R., Caselli, E., Gentili, V., Lazzarotto, T., Trombelli, L. (2008). Human herpesvirus 7, Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in periodontal tissues of periodontally diseased and healthy subjects. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(10), 831-837.
- Saboia-Dantas, C.J., Coutin de Toledo, L.F., Siqueira, J.F.Jr., Sampaio-Filho, H.R., Carvalho, J.J., Pereira, M.J. (2008). Natural killer cells and alterations in collagen density: signs of periradicular herpesvirus infection? *Clinical Oral Investigations*, 12(2), 129-135.
- Saha, A., Robertson, E.S. (2011). Epstein-Barr virus associated B-cell lymphomas: pathogenesis and clinical outcomes. *Clinical Cancer Research*, 17(10), 3056-3063.
- Sahin, S., Saygun, I., Kubar, A., Slots, J. (2009). Periodontitis lesions are the main source of salivary cytomegalovirus. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(4), 340-342.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Saito, T., Shimazaki, Y., Sakamoto, M. (1998). Obesity and periodontitis. *The New England Journal of Medicine*, 339(7), 482-483.
- Saito, T., Shimazaki, Y., Koga, T., Tsuzuki, M., Ohshima, A. (2001). Relationship between upper body obesity and periodontitis. *Journal of Dental Research*, 80(7), 1631-1636.
- Saito, T., Shimazaki, Y., Kiyohara, Y., Kato, I., Kubo, M., Iida, M., Yamashita, Y. (2005). Relationship between obesity, glucose tolerance, and periodontal disease in Japanese women: the Hisayama study. *Journal of Periodontal Research*, 40(4), 346-353.
- Salminen, A., Gursoy, U.K., Paju, S., Hyvärinen, K., Mantyla, P., Buhlin, K., Könönen, E., Nieminen, M.S., Sorsa, T., Sunisalo, J., Pussinen, P. (2014). Salivary biomarkers of bacterial burden, inflammatory response and tissue destruction in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(5), 442-450.
- Salvi, G.E., Lawrence, H.P., Offenbacher, S., Beck, J.D. (1997). Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000*, 14, 173-201.

- Sanbonmatsu Sámez, S., Pérez Ruiz, M., Navarro Marí, J.M. (2014). Infección por citomegalovirus humano. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(Suppl 1), 15-22.
- Santagelo, R., D'Ercole, S., Graffeo, R., Marchetti, S., Deli, G., Nacci, A., Piccolomini, R., Cattani, P., Fadda, G. (2004). Bacterial and viral DNA in periodontal disease: a study using multiplex PCR. *The New Microbiologica*, 27(2), 133-137.
- Sanz, M., Van Winkelhoff, A.J., Herrera, D., Dellemijn-Kippuw, N., Simón, R., Winkel, E. (2000). Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *European Journal of Oral Sciences*, 108(5), 383-392.
- Saygun, I., Sahin, S., Özdemir, A., Kurtis, B., Yapar, M., Kubar, A., Özcan, G. (2002). Detection of Human Viruses in patients with chronic periodontitis and the relationship between viruses and clinical parameters. *Journal of Periodontology*, 73(12), 1437-1443.
- Saygun, I., Kubar, A., Özdemir, A., Yapar, M., Slots, J. (2004a). Herpesviral-bacterial interrelationships in aggressive periodontitis. *Journal Periodontal Research*, 39(4), 207-212.
- Saygun, I., Yapar, M., Özdemir, A., Kubar, A., Slots, J. (2004b). Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus type 1 in periodontal abscesses. *Oral Microbiology and Immunology*, 19(2), 83-87.
- Saygun, I., Kubar, A., Özdemir, A., Slots, J. (2005). Periodontitis lesions are a source of salivary cytomegalovirus and Epstein-Barr virus. *Journal of Periodontal Research*, 40(2), 187-191.
- Saygun, I., Kubar, A., Sahin, S., Sener, K., Slots, J. (2008). Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 43(3), 352-359.
- Saygun, I., Nizam, N., Keskiner, I., Bal, V., Kubar, A., Açıkkel, C., Serdar, M., Slots, J. (2011). Salivary infectious agents and periodontal disease status. *Journal of Periodontal Research*, 46(2), 235-239.
- Scannapieco, F.A. (1994). Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 5(3-4), 203-248.
- Scarel-Caminaga, R.M., Trevilatto, P.C., Souza, A.P., Brito, R.B. Jr., Line, S.R. (2003). Investigation of IL4 gene polymorphism in individuals with different levels of chronic periodontitis in a Brazilian population. *Journal of Clinical Periodontology*, 30(4), 341-345.
- Schaefer, A.S., Bochenek, G., Manke, T., Nothnagel, M., Graetz, C., Thien, A., Jockel-Schneider, Y., Harks, I., Staufienbiel, I., Wijmenga, C., Eberhard, J., Guzeldemir-Akcakanat, E., Cine, N., Folwaczny, M., Noack, B., Meyle, J., Eickholz, P., Trombelli, L., Scapoli, C., Nohutcu, R., Bruckmann, C., Doerfer, C., Jepsen, S., Loss, B.G., Schreiber, S. (2013). Validation of reported genetic risk factors for periodontitis in a large-scale replication study. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(6), 563-572.

- Schenkein, H.A. (2006). Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontology 2000*, 40, 77-93.
- Schenkein, H.A., Loss, B.G. (2013). Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(Suppl 14), S51-69.
- Schochetman, G., Ou, C.Y., Jones, W.K. (1988). Polymerase chain reaction. *The Journal of Infectious Diseases*, 158(6), 1154-1157.
- Sester, M., Sester, U., Gärtner, B.C., Girndt, M., Meyerhans, A., Köhler, H. (2002). Dominance of virus-specific CD8 T cells in human primary cytomegalovirus infection. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(10), 2577-2584.
- Shapira, L., Wilensky, A., Kinane, D.F. (2005). Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(Suppl 6), 72-86.
- Simmen, K.A., Singh, J., Luukkonen, B.G., Lopper, M., Bittner, A., Miller, N.E., Jackson, M.R., Compton, T., Früh, K. (2001). Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), 7140-7145.
- Singh, N. (2006). Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: new challenges and their implications for preventive strategies. *Journal of Clinical Virology*, 35(4), 474-477.
- Sinzger, C., Digel, M., Jahn, G. (2008). Cytomegalovirus cell tropism. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 325, 63-83.
- Sissons, J.G., Bain, M., Wills, M.R. (2002). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *The Journal of Infection*, 44(2), 73-77.
- Skopek, R.J., Liljemark, W.F. (1994). The influence of saliva on interbacterial adherence. *Oral Microbiology and Immunology*, 9(1), 19-24.
- Slots, J., Gibbons, R. (1978). Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *assacharolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pockets. *Infection and Immunity*, 19(1), 254-264.
- Slots, J., Sugar, C., Kamma, J.J. (2002). Cytomegalovirus periodontal presence is associated with subgingival *Dialister pneumosintes* and alveolar bone loss. *Oral Microbiology and Immunology*, 17(6), 369-374.
- Slots, J., Kamma, J.J., Sugar, C. (2003). The herpesvirus-*Porphyromonas gingivalis*-periodontitis axis. *Journal of Periodontal Research*, 38(3), 318-323.
- Slots, J. (2005) Herpesviruses in periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 38, 33-62.
- Slots, J. (2010). Human viruses in periodontitis. *Periodontology 2000*, 53, 89-110.
- Slots, J., Slots, H. (2011). Bacterial and viral pathogens in saliva: disease relationship and infectious risk. *Periodontology 2000*, 55(1), 48-69.
- Smith MacDonald, E., Nowzari, H., Contreras, A., Flynn, J., Morrison, J., Slots, J. (1998). Clinical and microbiological evaluation of a bioabsorbable and a nonresorbable barrier membrane in the treatment of periodontal intraosseous lesions. *Journal of Periodontology*, 69(4), 445-453.



- Smith, T.F., Espy, M.J., Mandrekar, J., Jones, M.F., Cockerill, F.R., Patel, R. (2007). Quantitative real-time polymerase chain reaction for evaluating DNAemia due to cytomegalovirus, Epstein-barr virus, and BK virus in solid organ transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 45(8), 1056-1061.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Goodson, J.M., Lindhe, J. (1984). New concepts of destructive periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 11(1), 21-23.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Dzink, J.L., Hillman, J.D. (1988). Associations between microbiol species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiology and Immunology*, 3(1), 1-7.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D. (1992). The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *Journal of Periodontology*, 63(Suppl 4), 322-331.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D. (1997). The nature of periodontal disease. *Annals of Periodontology*, 2(1), 3-10.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C., Kent, R.L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134-144.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*, 28, 12-55.
- Soderberg-Naucler, C. (2006). Human cytomegalovirus persists in its host and attacks and avoids elimination by the immune system. *Critical Reviews in Immunology*, 26(3), 231-264.
- Soetens, O., Vauloup-Fellous, C., Foulon, I., Dubreuil, P., De Saeger, B., Grangeot-Keros, L., Naessens, A. (2008). Evaluation of different cytomegalovirus (CMV) DNA PCR protocols for analysis of dried blood spots from consecutive cases of neonates with congenital CMV infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(3), 943-946.
- Stack, G., Stacey, M.A., Humphreys, I.R. (2012). Herpesvirus exploitation of host immune inhibitory pathways. *Viruses*, 4(8), 1182-1201.
- Staras, S.A., Dollard, S.C., Radford, K.W., Flanders, D., Pass, R.F., Cannon, M.J. (2006). Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clinical Infectious Diseases*, 43(9), 1143-1151.
- Staras, S.A., Flanders, W.D., Dollard, S.C., Pass, R.F., McGowan, J.E.Jr., Cannon, M.J. (2008). Cytomegalovirus seroprevalence and childhood sources of infection: A population-based study among pre-adolescents in the United States. *Journal of Clinical Virology*, 43(3), 266-271.
- Stein, J.M., Reichert, S., Gautsch, A., Machulla, H.K. (2003). Are there HLA combinations typical supporting for or making resistant against aggressive and/or chronic periodontitis? *Journal of Periodontal Research*, 38(5), 508-571.
- Stein, J.M., Machulla, H.K., Smeets, R., Lampert, F., Reichert, S. (2008). Human leukocyte antigen polymorphism in chronic and aggressive periodontitis among Caucasians: a meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(3), 183-192.

- Stein, J.M., Said, Y.S., Kleines, M., OK, D., Kasaj, A., Reichert, S., Schulz, S., Scheithauer, S. (2013). Failure to detect and association between aggressive periodontitis and the prevalence of herpesviruses. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(1), 1-7.
- Stern, J., Shai, E., Zaks, B., Halabi, A., Houri-Haddad, Y., Shapira, L., Palmon, A. (2004). Reduced expression of gamma interferon in serum and marked lymphoid depletion induced by *Porphyromonas gingivalis* increase murine morbidity and mortality due to cytomegalovirus infection. *Infectious and Immunity*, 72(10), 5791-5798.
- Stevens, S.J., Verschuuren, E.A., Pronk, I., van Der Bij, W., Harmsen, M.C., The, T.H., Meijer, C.J., van Den Brule, A.J., Middeldorp, J.M. (2001). Frequent monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of posttransplant lymphoproliferative disease in high-risk patients. *Blood*, 97(5), 1165-1171.
- Streckfus, C.F., Bigler, L.R. (2002). Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Diseases*, 8(2), 69-76.
- Sugano, N., Ikeda, K., Oshikawa, M., Idesawa, M., Tanaka, H., Sato, S., Ito, K. (2004). Relationship between *Porphyromonas gingivalis*, Epstein-Barr virus infection and reactivation in periodontitis. *Journal of Oral Science*, 46(4), 203-206.
- Suzuki, N., Nakano, Y., Kiyoura, Y. (2006). Characterizing the specific coaggregation between *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype c strains and *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. *Oral Microbiology and Immunology*, 21(6), 385-391.
- Takeuchi, Y., Umeda, M., Sakamoto, M., Benno, Y., Huang, Y., Ishikawa, I. (2001). *Treponema socranskii*, *Treponema denticola*, and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology*, 72(10), 1354-1363.
- Tan, K.S., Woo, C.H., Ong, G., Song, K.P. (2001). Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in an ethnic adult Chinese population. *Journal of Clinical Periodontology*, 28(9), 886-890.
- Tan, K.S., Song, K.P., Ong, G. (2002). Cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Occurrence and association with periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 37(4), 268-272.
- Tanaka, T., Kogawa, K., Sasa, H., Nonoyama, S., Furuya, K., Sato, K. (2009). Rapid and simultaneous detection of 6 types of human herpes virus (herpes simplex virus, varicella-zoster virus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, human herpes virus 6A/B, and human herpes virus 7) by multiplex PCR assay. *Biomedical Research*, 30(5), 279-285.
- Tantivanich, S., Laohapand, P., Thaweeboon, S., Desakorn, V., Wuthinuntiwong, P., Chalermtaranukul, S., Pansri, P., Amarapal, P., Balachandra, K., Chantratita, W., Dhepakson, P. (2004). Prevalence of cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and Epstein-Barr virus in periodontitis patients and healthy subjects in the Thai population. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 35(3), 635-640.

- Tarasevich, I.V., Shaginyan, I.A., Mediannikov, O.Y. (2003). Problems and perspectives of molecular epidemiology of infectious diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990, 751-756.
- Taylor, G.W., Burt, B.A., Becker, M.P., Genco, R.J., Shlossman, M., Knowler, W.C., Pettitt, D.J. (1998). Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *Journal of Periodontology*, 69(1), 76-83.
- Taylor, J.J., Preshaw, P.M., Lalla, E. (2013). A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(Suppl 14), S113-134.
- Teanpaisan, R., Douglas, C.W.I., Walsh, T.F. (1995). Characterisation of black-pigmented anaerobes isolated from diseased and healthy sites. *Journal of Periodontal Research*, 30(4), 245-251.
- Tervonen, T., Karjalainen, K. (1997). Periodontal disease related to diabetic status. A pilot study of the response to periodontal therapy in type 1 diabetes. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(7), 505-510.
- Testa, M., Ruiz de Valladares, R., Benito de Cárdenas, I.L. (1999). Correlation between bacterial counts in saliva and subgingival plaque. *Acta Odontológica Latinoamericana*, 12(2), 63-74.
- Teughels, W., Sliepen, I., Quirynen, M., Kinder Haake, S., Van Eldere, J., Fives-Taylor, P., Van Ranst, M. (2007). Human cytomegalovirus enhances *A. actinomycetemcomitans* adherence to cells. *Journal of Dental Research*, 86(2), 175-180.
- Tezal, M., Grossi, S.G., Ho, A.W., Genco, R.J., Pitiphat, W., Merchant, A.T., Rimm, E.B., Joshupura, K.J. (2004). Alcohol consumption and periodontal disease. The Third National Health and Nutrition Examination Survey-Alcohol consumption increases periodontitis risk. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(7), 484-488.
- Thiha, K., Takeuchi, Y., Umeda, M., Huang, Y., Ohnishi, M., Ishikawa, I. (2007). Identification of periodontopathic bacteria in gingival tissue of Japanese periodontitis patients. *Oral Microbiology and Immunology*, 22(3), 201-207.
- Thomas, M.V., Branscum, A., Miller, C.S., Ebersole, J., Al-Sabbagh, M., Schuster, J.L. (2009). Within-subject variability in repeated measures of salivary analytes in healthy adults. *Journal of Periodontology*, 80(7), 1146-1153.
- Thomasini, R.L., Bonon, S.H., Durante, P., Costa, S.C. (2012). Correlation of cytomegalovirus and human herpesvirus 7 with CD3+ and CD3+ CD4+ cells in chronic periodontitis patients. *Journal of Periodontal Research*, 47(1), 1114-1120.
- Thorley-Lawson, D.A. (2001). Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 1(1), 75-82.
- Thorley-Lawson, D.A., Gross, A. (2004). Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *The New England Journal of Medicine*, 350(13), 1328-1337.
- Thorley-Lawson, D.A., Hawkins, J.B., Tracy, S.I., Shapiro, M. (2013). The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection. *Current Opinion in Virology*, 3(3), 227-232.

- Thorstensson, H., Hugoson, A.P. (1993). Periodontal disease experience in adult long-duration insulin-dependent diabetics. *Journal of Clinical Periodontology*, 20(5), 352-358.
- Ting, M., Contreras, A., Slots, J. (2000). Herpesviruses in localized juvenile periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 35(1), 17-25.
- Tomita, S., Komiya-Ito, A., Imamura, K., Kita, D., Ota, K., Takayama, S., Makino-Oi, A., Kinumatsu, T., Ota, M., Saito, A. (2013). Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in Japanese patients with generalized chronic and aggressive periodontitis. *Microbial Pathogenesis*, 61-62, 11-15.
- Tomkinson, B.E., Maziarz, R., Sullivan, J.L. (1989). Characterization of the T cell-mediated cellular cytotoxicity during acute infectious mononucleosis. *The Journal of Immunology*, 143(2), 660-670.
- Tonetti, M.S., Muller-Campanile, V., Lang, N.P. (1998). Changes in the prevalence of residual pockets and tooth loss in treated periodontal patients during a supportive maintenance care program. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(12), 1008-1016.
- Torrunguang, K., Bandhaya, P., Likittanasombat, K., Grittayaphong, C. (2009). Relationship between the presence of certain bacterial pathogens and periodontal status of urban Thai adults. *Journal of Periodontology*, 80(1), 122-129.
- Tuite-McDonnell, M., Griffen, A.L., Moeschberger, M.L., Dalton, R.E., Fuerst, P.A., Leys, E.J. (1997). Concordance of *Porphyromonas gingivalis* colonization in families. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(2), 455-461.
- Umeda, M., Chen, C., Bakker, I., Contreras, A., Morrison, J.L., Slots, J. (1998a). Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *Journal of Periodontology*, 69(10), 1111-1118.
- Umeda, M., Contreras, A., Chen, C., Bakker, I., Slots, J. (1998b). The utility of whole saliva to detect the oral presence of periodontopathic bacteria. *Journal of Periodontology*, 69(7), 828-833.
- Umemoto, T., Li, M., Namikawa, I. (1997) Adherence of human oral spirochetes by collagen-binding proteins. *Microbiology and Immunology*, 41(12), 917-923.
- Umemoto, T., Yoshimura, F., Kureshiro, H., Hayashi, J., Noguchi, T., Ogawa, T. (1999). Fimbria-mediated coaggregation between human oral anaerobes *Treponema medium* and *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and Immunology*, 43(9), 837-845.
- Urquiza, M., Suárez, J., Lopez, R., Vega E., Patino, H., Garcia, J., Patarroyo, M.A., Guzman, F., Patarroyo, M.E. (2004). Identifying gp85-regions involved in Epstein-Barr virus binding to B-lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(1), 221-229.
- van der Velden, U., van Winkelhoff, A.J., Abbas, F., de Graaf, J. (1986). The habitat of periodontopathic microorganisms. *Journal of Clinical Periodontology*, 13(3), 243-248.
- van Dyke, T.E., Sheileh, D. (2005). Risk factors for periodontitis. *Journal of the International Academy of Periodontology*, 7(1), 3-7.

- van Winkelhoff, A.J., Bosch-Tijhof, C.J., Winkel, E.G., van der Reijden, W.A. (2001). Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. *Journal of Periodontology*, 72(5), 666-671.
- van Winkelhoff, A.J., Loos, B.G., van der Reijden, W.A., van der Velden, U. (2002). *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(11), 1023-1028.
- Velazco, C.H., Coelho, C., Salazar, F., Contreras, A., Slots, J., Pacheco, J.J. (1999). Microbiological features of Papillon-Lefèvre syndrome periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 26(9), 622-627.
- Verdugo, F., Castillo, A., Simonian, K., Russo, P., D'Addona, A., Raffaelli, L., Moragues, M.D., Quindós, G., Pontón, J. (2012). Periodontopathogen and Epstein-Barr virus contamination affects transplanted bone volumen in sinus augmentation. *Journal of Periodontology*, 83(2), 162-173.
- Verdugo, F., Castillo, A., Castillo, F., Uribarri, A. (2015). Epstein-Barr virus associated peri-implantitis: a split-mouth study. *Clinical Oral Investigations*, 19(2), 535-543.
- Vieira, E.M., Raslan, S.A., Wahasugui, T.C., Avila-Campos, M.J., Marvulle, V., Gaetti-Jardim Júnior, E. (2009). Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Brazilian Indians from Umutina Reservation, Mato Grosso, Brazil. *Journal of Applied Oral Science*, 17(5), 440-445.
- Villegas, E., Santiago, O., Sorlózano, A., Gutierrez, J. (2010). New strategies and patent therapeutics in EBV-associated diseases. *Mini Reviews in Medical Chemistry*, 10(10), 914-927.
- von Troil-Lindén, B., Torkko, H., Alaluusua, S., Wolf, J., Jousimies-Somer, H., Asikainen, S. (1995). Periodontal findings in spouses. A clinical, radiographic and microbiological study. *Journal of Clinical Periodontology*, 22(2), 93-99.
- Wara-aswapati, N., Boch, J.A., Auron, P.E. (2003). Activation of interleukin 1 $\beta$  gene transcription by human cytomegalovirus: molecular mechanisms and relevance to periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 18(2), 67-71.
- Wara-aswapati, N., Pitiphat, W., Chanchaimongkon, L., Taweekaisupapong, S., Boch, J.A., Ishikawa, I. (2009). Red bacterial complex is associated with the severity of chronic periodontitis in a Thai population. *Oral Diseases*, 15(5), 354-359.
- Warren, K.R., Postolache, T.T., Groer, M.E., Pinjari, O., Kelly, D.L., Reynolds, M.A. (2014). Role of chronic stress and depression in periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 64(1), 127-138.
- White, C.A., Cross, S.M., Kurilla, M.G., Kerr, B.M., Schmidt, C., Misko, I.S., Khanna, R., Moss, D.J. (1996). Recruitment during infectious mononucleosis of CD3+ CD4+ CD8+ virus-specific cytotoxic T cells which recognise Epstein-Barr virus lytic antigen BHRF1. *Virology*, 219(2), 489-492.
- Wolf, D.L., Neiderud, A.M., Hinckley, K., Dahlén, G., van de Winkel, J.G., Papapanou, P.N. (2006). Fc $\gamma$  receptor polymorphisms and periodontal status: a prospective follow-up study. *Journal of Clinical Periodontology*, 33(10), 691-698.

- Wood, N., Johson, R.B., Streckfus, C.F. (2003). Comparison of body composition and periodontal disease using nutritional assesment techniques: Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Journal of Clinical Periodontology*, 30(4), 321-327.
- Wu, Y.M., Yan, J., Ojcius, D.M., Chen, L.L., Gu, Z.Y., Pan, J.P. (2007). Correlation between infections with different genotypes of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in subgingival samples and periodontal status of patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(11), 3665-3670.
- Yamada, M., Ikegami, A., Kuramitsu, H.K. (2005). Synergistic biofilm formation by *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiology Letters*, 250(2), 271-277.
- Yamamoto, N., Wakabayashi, T., Murakami, K. (2002). Intraocular and plasma HIV-1 RNA in HIV-infected patients with CMV retinitis and HIV-infected controls. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 34(10), 742-745.
- Yano-Higuchi, K., He, T., Umeda, M., Ishikawa, I. (2000). Prevalence of *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival microflora of Japanese patients with adult and rapidly progressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 27(8), 597-602.
- Yao, E.S., Lamont, R.J., Leu, S.P., Weinberg, A. (1996). Interbacterial binding among strains of pathogenic and commensal oral bacterial species. *Oral Microbiology and Immunology*, 11(1), 35-41.
- Yapar, M., Saygun, I., Özdemir, A., Kubar, A., Sahin, S. (2003). Prevalence of human herpesviruses in patients with aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology*, 74(11), 1634-1640.
- Yoshida, Y.K., Suzuki, N., Nakano, Y., Shibuya, K., Ogawa, Y., Koga, T. (2003). Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and *Porphyromonas gingivalis* in Japanese adults. *Oral Microbiology and Immunology*, 18(3), 135-139.
- Young, L.S., Rickinson, A.B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature Reviews Cancer*, 4(10), 757-768.
- Zahran, F., Ghalwash, D., Shaker, O., Al-Johani, K., Scully, C. (2015). Salivary micro-RNAs in oral cancer. *Oral Diseases*, 17, doi: 10.1111/odi.12340.
- Zambon, J.J. (1996a). Periodontal diseases: microbial factors. *Annals of Periodontology*, 1(1), 879-925.
- Zambon, J.J., Grossi, S.G., Machtei, E.E., Ho, A.W., Dunford, R., Genco, R.J. (1996b). Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *Journal of Periodontology*, 67(Suppl 10), 1050-1054.
- Zamora-Perez, A.L., Ortiz-García, Y.M., Lazalde-Ramos, B.P., Guerrero-Velázquez, C., Gómez-Meda, B.C., Ramírez-Aguilar, M.A., Zúñiga-González, G.M. (2015). Increased micronuclei and nuclear abnormalities in bucal mucosa and oxidative damage in saliva from patients with chronic and aggressive periodontal diseases. *Journal of Periodontal Research*, 50(1), 28-36.

- Zeng, X.T., Liu, D.Y., Kwong, J.S., Leng, W.D., Xia, L.Y., Mao, M. (2015). Meta-analysis of association between interleukin-1 $\beta$  C-511T polymorphism and chronic periodontitis susceptibility. *Journal of Periodontology*, 5(3), 1-16.
- Zhang, S., Zhou, Y.H., Li, L., Hu, Y. (2010). Monitoring human cytomegalovirus infection with nested PCR: comparison of positive rates in plasma and leucocytes and with quantitative PCR. *Virology Journal*, 7, 73, doi: 10.1186/1743-422X-7-73.

# **x. ANEXO**





# **DETECTION OF HERPESVIRUSES AND PERIODONTAL PATHOGENS IN GINGIVAL CREVICULAR FLUID AND SALIVA SAMPLES OF PATIENTS WITH CHRONIC PERIODONTITIS**

## **ABSTRACT**

## **INTRODUCTION**

Periodontal diseases are considered as inflammatory conditions affecting the periodontium that are known to have a primarily multi-bacterial aetiology. In the last 15 years, however, several studies have suggested that certain viruses might play a role in the pathogenesis of gingivitis and periodontitis. In particular, DNA from herpesviruses such as human cytomegalovirus (HCMV) and Epstein-Barr virus (EBV) have been detected in high percentages of subgingival plaque samples and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis, gingivitis and HIV-associated periodontitis. In contrast, very low prevalence of such viruses has been detected in periodontally healthy individuals. Other investigations revealed an association between the detection of these viruses and recognized periodontopathogenic bacteria in periodontitis patients, and between the detection of viruses and periodontal disease activity. Based on these data, a new pathogenesis model for periodontitis suggesting a herpesviral-bacterial co-infection has been proposed. Thereby, the ability of these herpesviruses to induce immunosuppression and a possible direct cytopathic effect on fibroblasts, keratinocytes and inflammatory cells have been proposed as possible mechanisms of periodontal pathogenesis.

However, maintenance of this model is challenged by studies that could not confirm an increased prevalence of these herpesviruses in chronic and aggressive periodontitis patients or that could not find differences in the viral load between shallow and deep pockets. This inconsistency might be due to methodological reasons or differences in the investigated populations. Most of the previous findings were based on ultrasensitive molecular techniques (nested PCR); a drawback of this screening assay is the false-positive results. It is noteworthy to mention, most of the studies were performed in populations from South America, Turkey, China or in African American subjects. As the prevalence of herpesviruses depends on the geographical, socioeconomic and

possibly the ethnical status, different associations can be expected and, thus, findings should be differentiated.

On the other hand, traditionally, microbiological studies of periodontitis have been based on subgingival plaque samples. However, as saliva is an easily and inexpensively accessible biological fluid, a whole saliva sample may offer a fast and easy alternative to subgingival plaque samples that can be performed in any clinical setting for determining viral and bacterial profile in relation to periodontitis.

## **OBJECTIVES**

No studies of the prevalence of herpesviruses in periodontitis in Spain have been performed to date. Therefore, and due to the contradictory results of recent articles, the aim of our study was to evaluate the prevalence of two herpesviruses (HCMV and EBV) and the possible associations of these herpesviruses and five periodontopathic bacteria (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola*), in gingival crevicular fluid (GCF) and saliva samples, in patients with chronic periodontitis and in periodontally healthy subjects. This investigation also assessed the association of these microorganisms to periodontal clinical parameters and whether there is any concordance between the detection of HCMV, EBV and periodontopathic bacteria in GCF and saliva samples.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study population**

A total of 48 adult subjects participated in this case-control study that was carried out between September 2013 and May 2014. The Research and Ethics Committee of San Carlos University Hospital of Madrid approved the study protocol.

The individuals were recruited amongst the patients referred for periodontal therapy to the Graduate Periodontal Clinic and from the Reception Department of the School of Dentistry, University Complutense of Madrid, Spain, as well as amongst subjects working or studying in this academic institution that volunteered to participate in this study. For the evaluation of the anamnestic data, all participants were interviewed according to a standardized protocol. Subjects were asked about their ethnic origin,

medical history, medications, smoking habit, previous history of periodontitis and oral hygiene habits.

Inclusion criteria were: (i) resident in the Autonomous Region of Madrid; (i) age 20-70 years; (ii) Caucasian ethnicity; (iii) presence of  $\geq 16$  natural teeth in mouth, excluding third molars. Exclusion criteria from the study were (i) smoking habit; (ii) current pregnancy or in lactation; (iii) presence of systemic diseases and/or medication suspected to affect the periodontium; (iv) need of antibiotic prophylaxis; (v) presence of acute dental or periodontal diseases; (vi) professional dental cleaning or periodontal treatment in the previous 6 months; (vii) intake of systemic antibiotics within the last 3 months; (viii) use of antimicrobial mouthrinse in the last 2 weeks.

The sample population received a standard periodontal examination, comprised of a full-mouth assessment at six sites per tooth, evaluating the plaque index (PII) (O'Leary et al. 1972), probing pocket depth (PPD), clinical attachment level (CAL) and bleeding on probing (BOP) (Mühlemann & Son, 1971), and depending on their periodontal condition, they were assigned to one of the two groups according to the following criteria:

- Chronic periodontitis group (24 subjects): adult patients, with radiographic evidence of bone loss in each quadrant of the dentition, and presence of  $\geq 4$  sites with PPD  $\geq 4$  mm and CAL  $\geq 3$  mm.
- Control group (24 individuals): adult patients, with BOP in less than 25% of the sites and without loss of attachment, demonstrated by having less than 3 sites with PPD  $> 3$  mm and CAL  $> 2$  mm.

### **Viral and bacterial sampling**

Saliva samples were collected from all participants before the periodontal examination, to avoid contamination with blood. Saliva was stored in an  $-80^{\circ}\text{C}$  freezer up until tested. GCF samples were collected, using a sterile paper point, from the deepest bleeding site of each quadrant for 20 seconds, from all of the patients in the chronic periodontitis group. In the control group, the mesio-buccal site from the first molars was selected (one per quadrant). All four-paper points with GCF samples were pooled together into a sterile microfuge tube and were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until processed.

## DNA extraction and PCR procedures

Viral and bacterial DNA extraction was performed using the QIAamp Mini kit (Qiagen, Venlo, Holland). The test assay used to detect of herpesviral nucleic acids (HCMV and EBV) were in-house qualitative real-time PCR assay using the *RealCycler* CMEB<sup>®</sup> kit (Progenie Molecular, Valencia, Spain). Primers for the glycoprotein B of HCMV and LMP1 of EBV was set. Detection limits for PCR assays were 1 copies/μl (HCMV) and 10 copies/μl (EBV), respectively. To detect the periodontopathogenic bacterial species, the microIDent<sup>®</sup> kit (Hain Lifescience, Nehren, Germany) was used: a multiplex PCR of 16s rDNA, followed by a simultaneous reverse hybridization for the following species: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* and *T. denticola*. This process produces a colorimetric reaction on the DNA.STRIP<sup>®</sup>. The colour intensity corresponds to the initial level of DNA in the sample. According to the manufacturer, the cut-off of the test was set for *A. actinomycetemcomitans* to a 10<sup>3</sup> genome equivalents and 10<sup>4</sup> for the other bacterial species.

## Statistical analysis

Data processing and statistical analysis were performed using software packages (SPSS for Windows, version 22.0). Confidence intervals were calculated at the 95%. *p*-values of  $\leq 0.05$  were considered to be statistically significant.

## RESULTS

Patients with chronic periodontitis were on average older, and as expected, mean values of all periodontal clinical parameters (PLI, PD, CAL and BOP) were higher than in controls and these differences were statistically significant. Also, patients had lost more teeth than control subjects.

Samples from GCF and saliva revealed a low prevalence of both herpesviruses. HCMV DNA was not detected in any of the subjects, neither in GCF, nor in saliva. EBV DNA was detected in only one subject from the control group (4.2%) in GCF samples. In saliva samples, it was detected in three chronic periodontitis patients (12.5%) and in five controls (20.8%). These differences did not reach statistical significance in terms of detection frequency of EBV in GCF samples ( $p=0.312$ ) and in saliva ( $p=0.439$ ).

In GCF samples, the frequencies of detection of the targeted bacterial species, in the chronic periodontitis group, were 12.5% for *A. actinomycetemcomitans*, 91.7% for *P. gingivalis*, 70.8% for *P. intermedia*, 91.7% for *T. forsythia*, and 79.2% for *T. denticola*. In the control group, *A. actinomycetemcomitans* was detected in 4.2%, *P. gingivalis* in 12.5%, *P. intermedia* in 70.8%, *T. forsythia* in 91.7%, and *T. denticola* in 79.2%. The differences in detection frequencies between the groups were statistically significant for *P. gingivalis* ( $p < 0.001$ ), *P. intermedia* ( $p < 0.001$ ), *T. forsythia* ( $p < 0.001$ ) and *T. denticola* ( $p < 0.001$ ), but not for *A. actinomycetemcomitans* ( $p = 0.296$ ).

In saliva samples, the frequency detection, in the chronic periodontitis group, of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* and *T. denticola* were 16.7%, 79.2%, 12.5%, 79.2% and 83.3%, respectively. In the control group, *A. actinomycetemcomitans* was detected in 8.3%, *P. gingivalis* in 8.3%, *P. intermedia* in 4.2%, *T. forsythia* in 70.8%, and *T. denticola* in 45.8%. Statistically significant differences between both groups were found for *P. gingivalis* ( $p < 0.001$ ) and for *T. denticola* ( $p = 0.007$ ). No statistically significant differences for *A. actinomycetemcomitans* ( $p = 0.383$ ), for *P. intermedia* ( $p = 0.296$ ), and for *T. forsythia* ( $p = 0.505$ ) were found.

No association was found between EBV and the analysed bacterial species, either in GCF or in saliva. In contrast, statistically significant associations in GCF samples were observed between *P. gingivalis* and *P. intermedia* ( $p < 0.001$ ), between *P. gingivalis* and *T. forsythia* ( $p < 0.001$ ) and between *P. gingivalis* and *T. denticola* ( $p < 0.001$ ), with an OR of 7.36, 2.64, 8.28, respectively. *P. intermedia* was also significantly associated with *T. forsythia* ( $p = 0.001$ ) (OR 2.02) and with *T. denticola* ( $p < 0.001$ ) (OR 9.44). The strongest statistically significant association was observed between *T. forsythia* and *T. denticola* ( $p < 0.001$ ) (OR 10.41). In saliva, a statistically significant association was detected between *P. gingivalis* and *T. denticola* ( $p = 0.037$ ) (OR 1.56), and between *T. forsythia* and *T. denticola* ( $p = 0.001$ ) (OR 3.11).

The exhaustive CHAID analysis revealed PII to be the main predictor outcome implicated in the detection of EBV DNA in GCF, while in saliva, there were not significantly associated with the independent outcomes evaluated. The presence in GCF of *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* and *T. denticola* was statistically significant associated with the periodontal parameters studied (PII, PPD, CAL and BOP).

However, only the detection of *P. gingivalis* and *T. denticola* in saliva was associated with the periodontal outcomes and this reached statistical significance.

The concordance rate of both sampling methods was statistically significant for the detection of *A. actinomycetemcomitans* ( $p < 0.001$ ), *P. gingivalis* ( $p < 0.001$ ), *P. intermedia* ( $p = 0.007$ ), and *T. denticola* ( $p = 0.002$ ), but not statistically significant for EBV ( $p = 0.24$ ) and *T. forsythia* ( $p = 0.223$ ). The kappa values were 0.778 for *A. actinomycetemcomitans* and 0.751 for *P. gingivalis*, suggesting a high agreement between GCF and saliva samples. The kappa value for *T. denticola* was 0.404 and for *P. intermedia* 0.263, indicating a moderate and poor agreement, respectively between both sample methods. The agreement was very poor for the detection of EBV and *T. forsythia* (as shown by kappa test scores of 0.192 for EBV and of 0.171 for *T. forsythia*).

Using GCF sample as the reference, the sensitivity of viral and bacterial detection in saliva sample was 100% for EBV, 100% for *A. actinomycetemcomitans*, 80% for *P. gingivalis*, 22% for *P. intermedia*, 81% for *T. forsythia*, and 90% for *T. denticola*. The specificity of viral and bacterial detection of saliva was 85% for EBV, 95% for *A. actinomycetemcomitans*, 96% for *P. gingivalis*, 100% for *P. intermedia*, 35% for *T. forsythia*, and 54% for *T. denticola*.

## CONCLUSIONS

1. When real-time PCR is performed, the prevalence of HCMV and EBV DNA in our study population is low. HCMV DNA is not detected in any individuals, either in GCF or in saliva samples. Regarding EBV, no statistically significant differences are found in frequency detection between the chronic periodontitis group (GCF: 0%; saliva: 12.5%) and the control group (FCG: 4.2%; saliva: 20.8%).
2. No association is found between HCMV and EBV, or between these two viruses and the analysed periodontopathogenic bacteria. However, in GCF, all studied bacterial species are interrelated, with the exception of *A. actinomycetemcomitans*. In saliva, the only association is between *P. gingivalis* and *T. denticola*; and between *T. forsythia* and *T. denticola*.

3. In GCF, the presence of EBV is associated with a low PII, while the detection of *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* and *T. denticola* are associated with higher median values of PII, PPD, CAL and BOP. In saliva, only *P. gingivalis* and *T. denticola* are associated with the studied clinical parameters.
4. The concordance between the GCF and saliva samples to detect *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* is high; moderate for *T. denticola*; low for *P. intermedia*, and very low for EBV and *T. forsythia*. Consequently, saliva could be used as an alternative testing method to GCF samples for the detection of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. denticola*, but not recommended for the microbiological detection of EBV, *P. intermedia* and *T. forsythia*.
5. The results of this study do not support the previously proposed model of a herpesviral infection in periodontal disease, considering the low prevalence of these viruses, in GCF and saliva, and are not associated with the clinical parameters of periodontitis. Therefore, to be able to make a definitive conclusion, prospective studies with a sufficient number of subjects should be carried out; and, fundamentally, different infection markers of these viruses should be determined to be able to associate them to the periodontal status of the patient.